

Université de Montréal

**ÉVALUATION *IN VITRO* DE LA STÉRILISATION AU PEROXYDE
D'HYDROGÈNE SUR LES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE
PROTHÈSES UTILISÉES LORS DE STABILISATION DU GENOU
CHEZ LE CHIEN**

par

MATTHIEU GATINEAU

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques

avril 2011

©Matthieu Gatineau, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé:

**ÉVALUATION *IN VITRO* DE LA STÉRILISATION AU PEROXYDE
D'HYDROGÈNE SUR LES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE
PROTHÈSES UTILISÉES LORS DE STABILISATION DU GENOU
CHEZ LE CHIEN**

Présenté par :

Matthieu Gatineau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Bertrand Lussier, président-rapporteur
Alexander De Oliveira El-Warrak, directeur de recherche
Christian Bolliger, co-directeur de recherche
Yvonne Elce, membre du jury

RÉSUMÉ

Objectif—Comparer les effets de la stérilisation au plasma de gaz de peroxyde d'hydrogène (HPGP) à l'oxyde d'éthylène (EO) et à la vapeur (ST) sur les propriétés physico-chimiques et d'adhésion bactérienne de fils de nylon et de polyéthylène.

Design expérimental—Etude *in vitro*.

Matériel—Des brins non stérilisés, stérilisés au HPGP, à l'EO et ST; de fil nylon leader (FNL), de fil de nylon pêche (FNP) et de fil de polyéthylène (PE) ont été utilisés.

Méthodes—Une analyse de surface au spectroscope photo-électronique à rayons X (XPS), une mesure de l'angle de contact, une analyse par microscopie à force atomique (AFM) et l'adhésion bactérienne de *Staphylococcus intermedius* et d'*Escherichia Coli* ont été testés sur les brins.

Résultats—Une oxydation de la surface de tous les échantillons stérilisés a été observée quelque soit la méthode de stérilisation. La stérilisation a augmenté significativement l'angle de contact pour tous les types de fil quelque soit la méthode. La rugosité n'a pas été affectée significativement par la méthode de stérilisation pour le FNL et FNP. L'adhésion bactérienne a été affectée significativement par la méthode de stérilisation. Le PE a un angle de contact, une rugosité et une adhésion bactérienne significativement plus élevée que le FNL et FNP, peu importe la méthode de stérilisation.

Conclusion—La stérilisation au HPGP constitue une alternative intéressante à la vapeur et l'EO. Le PE n'est peut être pas un matériel idéal par sa capacité d'adhésion bactérienne. De futures études sont nécessaires pour déterminer la signification clinique de ces trouvailles.

Mots clés : stérilisation, peroxyde d'hydrogène, oxyde d'éthylène, fil, nylon, polyéthylène, analyse de surface

ABSTRACT

Objective—To compare the effects of hydrogen peroxide gas plasma (HPGP), ethylene oxide (EO) and steam (ST) sterilizations on the physicochemical and bioadhesive properties of nylon and polyethylene lines used for stabilization of the canine stifle joint.

Study Design—In vitro study.

Samples—Non-sterilized, HPGP-, EO- and ST- sterilized samples of 36.3-kg test nylon leader line (NLL), 57.8-kg test nylon fishing line (NFL) and 2-mm Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMPE) were used.

Methods—Surface analysis of NLL, NFL and UHMPE non-sterilized and HPGP-, EO- and ST-sterilized samples was carried out by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), contact angle (CA) measurement, and atomic force microscopy (AFM). Staphylococcus intermedius and Escherichia Coli bacterial adherence were also tested.

Results—Surface oxidation was observed on all samples sterilized with HPGP, EO or ST process. All sterilization methods significantly increased the CA for the NLL, NFL and UHMPE. The roughness was not significantly affected by the method of sterilization for NLL, NFL and UHMPE. Bacterial adherence was significantly affected by the method of sterilization for NLL, NFL and UHMPE. UHMPE had significantly higher CA, roughness and bacterial adherence compared to NLL and NFL, no matter which sterilization method was used.

Conclusion—The effects of HPGP on the chemico-physical and bioadhesive properties of nylon and polyethylene lines compared positively to EO or ST, making HPGP an attractive alternative. UHMPE may not be a suitable material for suture prostheses regarding bacterial adherence properties. Future studies are required to determine the clinical significance of these findings.

Keywords : sterilization, hydrogen peroxyde, ethylene, suture, nylon, polyethylene, surface analysis

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | iv |
| Table des matières..... | vii |
| Liste des tableaux..... | xi |
| Liste des figures..... | xii |
| Liste des sigles et des abréviations..... | xiii |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| RECENSION DES ÉCRITS..... | 4 |
| I. Implants utilisés lors de stabilisation du grasset chez le chien..... | 5 |
| II. Stérilisation au plasma de gaz de peroxyde d'hydrogène..... | 6 |
| 1. Introduction..... | 6 |
| 2. Rappels sur les plasmas..... | 7 |
| 3. Description du procédé de stérilisation..... | 7 |
| 4. Le conditionnement..... | 9 |
| 5. Indicateurs biologiques..... | 9 |
| 6. Indications..... | 9 |
| 7. Contre-indications..... | 10 |
| 8. Discussion..... | 10 |

| | |
|---|----|
| III. Analyse de la composition chimique de surface par spectroscopie photo-électronique à rayons X (XPS)..... | 11 |
| 1. Introduction..... | 11 |
| 2. Principe..... | 11 |
| 3. Indications..... | 15 |
| 4. Discussion..... | 16 |
| IV. Évaluation de la mouillabilité de surface par goniométrie..... | 18 |
| 1. Introduction..... | 18 |
| 2. Principe..... | 18 |
| 3. Discussion..... | 22 |
| V. Évaluation de la rugosité de surface par microscopie à force atomique..... | 23 |
| 1. Introduction..... | 23 |
| 2. Interactions et modes d'utilisation..... | 24 |
| 3. Discussion..... | 28 |
| VI. Évaluation de l'adhésion bactérienne de surface..... | 29 |
| 1. Introduction..... | 29 |
| 2. Adhésion bactérienne – Principe..... | 30 |
| 3. Discussion..... | 32 |
| ÉTUDE EXPÉRIMENTALE..... | 33 |

Article 1 - Matthieu GATINEAU, DMV, IPSAV, Alexander O. EL-WARRAK, DMV, MSc, PhD, Rodrigo FRANCA, PhD, Christian BOLLIGER, Dr.med.vet., DACVS, DECVS

Physicochemical evaluation of hydrogen peroxyde gas plasma sterilization of nylon and polyethylene lines used for stabilization of the canine stifle joint.....35

| | |
|---------------------------------|----|
| I. Short abstract..... | 36 |
| II. Introduction..... | 37 |
| III. Materials and methods..... | 39 |
| IV. Results..... | 40 |
| V. Discussion..... | 43 |
| VI. References..... | 48 |
| VII. Tables..... | 56 |

Article 2 - Matthieu GATINEAU, DMV, IPSAV, Alexander O. EL-WARRAK, DMV, MSc, PhD, Christian BOLLIGER, Dr.med.vet., DACVS, DECVS, Michael MOUREZ, PhD, Frederic BERTHIAUME, MSc, Marie ARCHAMBAULT, MSc, PhD, DACVM

Bioadhesive evaluation of hydrogen peroxyde gas plasma sterilization of nylon and polyethylene lines used for stabilization of the canine stifle joint.....58

| | |
|---------------------------------|----|
| I. Short abstract..... | 59 |
| II. Introduction..... | 60 |
| III. Materials and methods..... | 61 |
| IV. Results..... | 63 |
| V. Discussion..... | 65 |

| | |
|----------------------------|----|
| VI. References..... | 69 |
| VII. Tables..... | 75 |
| DISCUSSION-CONCLUSION..... | 77 |
| SOURCES DOCUMENTAIRES..... | 81 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I - Exemple de composition chimique de surface déterminée par XPS.... | 14 |
| Tableau II (article) Table 1 - Chemical surface composition (%) determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines..... | 56 |
| Tableau III (article) Table 2 - Contact angle (mean \pm SD) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines..... | 57 |
| Tableau IV (article) Table 3 - Roughness (mean \pm SD) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines..... | 57 |
| Tableau V (article) Table 1 - Number of CFUs of <i>Staphylococcus intermedius</i> (mean \pm SD in log) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines..... | 75 |
| Tableau VI (article) Table 2 - Number of CFUs of <i>Escherichia coli</i> (mean \pm SD in log) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines..... | 75 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 - De gauche à droite : un fil de nylon pêche (Tortue La Soie-Neyme SA, Boulogne, France), un fil de nylon leader (Mason Hard Type Leader Material, Mason Tackle Company, Otisville, MI, USA), un fil de polyéthylène (Fibertape 2mm, Arthrex SAS, Lezennes, France)..... | 6 |
| Figure 2 - Exemple d'un spectre de composition chimique de surface de fil de nylon : à chaque pic correspond un élément chimique constitutif de la surface de l'implant étudié..... | 14 |
| Figure 3 - Forme d'une goutte déposée sur la surface d'un matériel quelconque : l'angle de contact, noté θ sur la figure ci-dessous permet de quantifier la qualité du mouillage..... | 19 |
| Figure 4 - Topographie de surface d'un fil de nylon leader obtenue au microscope à force atomique : à gauche, non stérilisé ; à droite, stérilisé à l'EO..... | 24 |

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS

AFM : *atomic force microscopy*

CA : *contact angle*

CFU : *colony forming units*

EO : *ethylene oxide*

HPGP : *hydrogen peroxide gas plasma*

IR : infra-rouge

LCC : ligament croisé crânial

MEB : microscopie électronique à balayage

NLL : *nylon leader line*

NFL : *nylon fishing line*

PE : polyethylene

Ra : moyenne arithmétique de la déviation de la hauteur du profil de surface

RMS : *root-mean-square*

S : coefficient d'étalement

SD : *standard deviation*

SL : suture latérale

ST : *steam*

UHMPE : *ultra high molecular weight polyethylene*

UV : ultraviolet

XPS : *X-ray photoelectron spectrometry*

INTRODUCTION

Le ligament croisé crânial (LCC) est un stabilisateur important du grasset chez le chien, et la rupture du LCC est l'une des conditions orthopédiques les plus communes chez cette espèce. (1-4) De nombreuses techniques chirurgicales ont été rapportées et sont classiquement classifiées en techniques extra-articulaires, intra-articulaires et dynamiques. La stabilisation extra-articulaire par suture latérale (SL) à l'aide d'implants synthétiques (fil de nylon ou de polyéthylène) est une technique courante et reconnue (5). De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer le matériel prosthétique le plus approprié (5-11), la meilleure méthode de fixation (5), et l'effet de différents procédés de stérilisation sur les propriétés mécaniques et biologiques des fils de nylon utilisés lors de SL (5,9-11). Il a été démontré que la stérilisation à la vapeur et à l'oxyde d'éthylène (EO *ethylene oxide*) affectent l'élongation et la force au bris des fils de nylon, et que l'EO affecte le moins ces propriétés (5,9-11). Cependant, des études humaines et vétérinaires suggèrent que l'EO pourrait être associé à certaines formes de cancer chez l'Homme (12-18). De plus, la stérilisation à l'EO, utilisant un gaz hautement réactif d'un point de vue chimique, peut entraîner des modifications de structures de certains polymères et les résidus d'EO présents à la surface de ces polymères peuvent également représenter un problème lorsqu'ils sont les principaux constituants d'implants biomédicaux (19,20). Récemment au Canada, des règles renforcées ont été mises en place afin de contrôler les émissions d'EO lors de son utilisation (21). L'équipement nécessaire à l'adaptation aux normes renforcées et à la réalisation de contrôles réguliers est excessivement coûteux. Pour cette raison, la communauté médicale, que ce soit en médecine humaine ou en médecine vétérinaire, s'intéresse de plus en plus à de nouveaux procédés de stérilisation et notamment la

stérilisation au plasma de gaz de peroxyde d'hydrogène (HPGP *hydrogen peroxide gas plasma*). Cette forme de stérilisation utilise le synergisme entre le peroxyde d'hydrogène et l'état de plasma (gaz ionisé) à basse température. Des résidus toxiques ou des émissions de peroxyde d'hydrogène n'ont pas été rapportés ; donc l'aération, la ventilation, ou d'autres procédés similaires ne sont pas nécessaires et l'opérateur n'est jamais en contact direct avec le peroxyde d'hydrogène. Une première étude sur les effets mécaniques de la stérilisation à l'HPGP sur les fils de nylon a permis de mettre en évidence que la stérilisation au HPGP était une alternative à l'EO (22). Cependant peu d'études ont porté leur attention sur les propriétés biologiques des implants synthétiques utilisés lors de stabilisation extra-articulaire du grasset chez le chien. La composition physico-chimique de ces matériaux synthétiques, leur prédisposition à l'adhérence bactérienne pouvant favoriser une infection post-opératoire souvent néfaste pour une récupération optimale, ou l'effet de différents procédés de stérilisation sur ce type d'implant sont autant de paramètres peu rapportés dans la littérature. Le but de ce projet était donc de comparer les effets biologiques *in vitro* de la stérilisation au HPGP, à l'EO et à la vapeur sur les fils de nylon et de polyéthylène utilisés lors de stabilisation extra-articulaire du grasset chez le chien lors de rupture du LCC.

Dans une première partie, l'étude visait à déterminer l'effet de la stérilisation au HPGP, à l'EO et à la vapeur sur les caractéristiques de composition chimique de surface de fils de nylon et de polyéthylène couramment utilisés lors de SL par analyse de surface au spectroscope photo-électronique à rayons X (XPS *X-ray photoelectron spectrometry*).

Dans une seconde partie, le projet consistait à évaluer l'état de mouillabilité de surface en mesurant l'angle de contact des fils de nylon et de polyéthylène par

goniométrie et de comparer l'effet de la stérilisation au HPGP, à l'EO et à la vapeur sur la mouillabilité.

Dans une troisième partie, l'objectif était de déterminer la rugosité de surface des fils de nylon et de polyéthylène par analyse microscopique à force atomique (AFM *atomic force microscopy*) et de comparer l'effet de la stérilisation au HPGP, à l'EO et à la vapeur sur la rugosité.

Dans une quatrième partie enfin, l'objectif était de déterminer et de comparer l'adhésion bactérienne sur les fils de nylon et de polyéthylène stérilisés au HPGP, à l'EO et à la vapeur.

RECENSION DES ÉCRITS

I. Implants utilisés lors de stabilisation du grasset chez le chien

La stabilisation extra-articulaire par suture latérale (SL) à l'aide d'un implant synthétique est une technique très courante et reconnue pour traiter la rupture du ligament croisé crânial chez le chien (5). Différents implants peuvent être utilisés tel que des implants en fil de nylon leader, de nylon pêche, de polyéthylène, monofilament ou multifilament (5,7-11,23,24). Toutefois peu d'études ont porté sur les propriétés biologiques de ces implants (5). Une étude rapporte une augmentation du diamètre de fil de nylon après stérilisation à la vapeur, indiquant que les propriétés physico-chimiques d'un matériel synthétique peuvent varier lors de la stérilisation (5). La surface de polymère tel que le polyéthylène est considérée comme hydrophobe, avec une faible énergie de surface qui facilitait traditionnellement le contact bactérien initialement (25,26). Il est également rapporté que les matériaux tressés ou multifilaments, permettant une adhésion bactérienne plus importante que pour des implants monofilaments, sont associés à une incidence plus élevée de réaction et d'infection en période postopératoire chez le chien (5,27). Toutefois, de nouvelles techniques chirurgicales de stabilisation extra-articulaire du grasset chez le chien utilisant de nouveaux implants synthétiques tressés de polyéthylène ont été décrites récemment (28,29). La cytotoxicité de certains types de suture est également connue et rapportée en médecine humaine (30,31), mais demeure peu étudiée en médecine vétérinaire pour ce type d'implant.

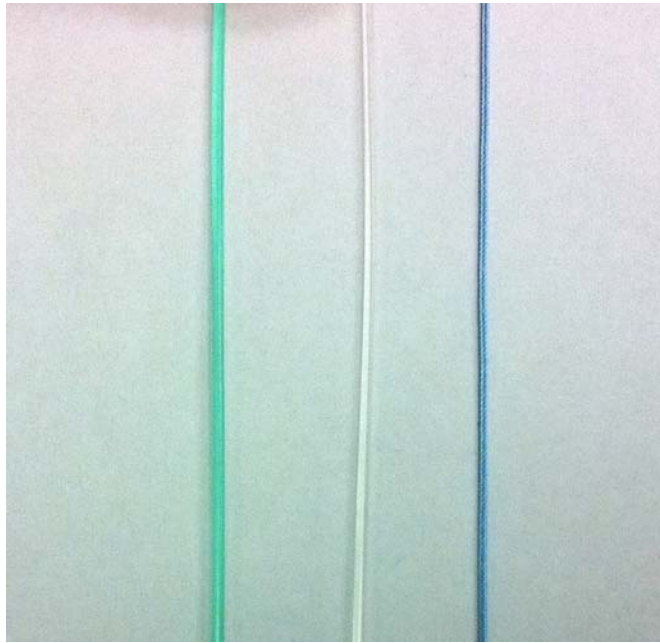


Figure 1 – De gauche à droite : un fil de nylon pêche (Tortue La Soie-Neyme SA, Boulogne, France), un fil de nylon leader (Mason Hard Type Leader Material, Mason Tackle Company, Otisville, MI, USA), un fil de polyéthylène (Fibertape 2mm, Arthrex SAS, Lezennes, France).

II. Stérilisation au plasma de gaz de peroxyde d'hydrogène

1. Introduction

La stérilisation des dispositifs médicaux et de leurs matériaux constitutifs joue un rôle majeur dans la qualité des soins en Médecine Humaine. La stérilisation à la vapeur est la méthode de référence pour les instruments thermorésistants. La stérilisation par plasma de peroxyde d'hydrogène est venue s'ajouter, dans certains cas, aux techniques classiques utilisées depuis plus longtemps, telles la stérilisation à l'oxyde d'éthylène ou la désinfection approfondie par immersion pour le traitement des dispositifs thermosensibles.

2. Rappel sur les plasmas

Le plasma est un phénomène naturel. Il est utilisé par les physiciens pour désigner le quatrième état de la matière qui se distingue de l'état solide, liquide et gazeux. Le plasma est un gaz dont les molécules ont été dissociées grâce à un apport d'énergie. Il en résulte la formation de différentes espèces chimiques (ions, électrons libres, radicaux libres, molécules excitées). Dans l'univers, 99% de la matière existe à l'état de plasma. On distingue ainsi, le plasma haute température généré sous de hautes pressions comme le soleil ou les étoiles et le plasma basse température généré sous des pressions comme les aurores boréales ou les néons.

Le procédé de stérilisation au HPGP repose sur le pouvoir bactéricide du peroxyde d'hydrogène activé sous forme de plasma froid.

3. Description du procédé de stérilisation

Une faible quantité de peroxyde d'hydrogène est introduite dans un vide quasi total. Le gaz est porté à l'état de plasma grâce à la création d'un champ électromagnétique produit par une fréquence radio. Le mécanisme en jeu consiste alors à une capture d'électrons sur des molécules et atomes présents qui, par réaction en chaîne, produisent des ions, des électrons accélérés et des radicaux libres. Il peut être décrit d'une façon simplifiée comme suit :

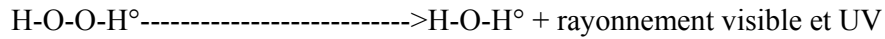
e^-

$\text{H-O-H} \longrightarrow \text{HO}^\bullet + \bullet\text{OH}$

1-10eV

$\text{HO}^\bullet + \text{H-O-H} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \bullet\text{O-O-H}$

e-



La durée du cycle est d'environ 75 minutes hors phase de vide et comprend 5 phases :

La phase de vide : diminution de la pression dans la chambre de stérilisation de 760 mmHg à 0,2 mmHg. Le vide est nécessaire à la vaporisation du peroxyde d'hydrogène contenu dans la capsule à l'état liquide. Si le temps nécessaire pour faire le vide dépasse 20 minutes, le cycle est annulé automatiquement par le microprocesseur de contrôle.

La phase d'injection d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 58% qui sous l'effet du vide et de la température (45°C) se vaporise. La concentration en peroxyde d'hydrogène est alors de 6mg/l.

La phase de diffusion : volatilisation et diffusion de façon homogène du gaz dans l'ensemble de la chambre de stérilisation (durée de 50 minutes environ).

La phase plasma où le peroxyde d'hydrogène est porté à l'état de plasma grâce à la création d'un champ électromagnétique produit par application durant 15 minutes d'une fréquence radio sur l'électrode interne de la chambre de stérilisation.

La phase de retour à la pression atmosphérique où les espèces se recombinent en molécules plus stables : eau et oxygène. Le système est ramené à la pression atmosphérique par introduction d'air filtré.

4. Le conditionnement

Les matériaux de conditionnement doivent être conçus de manière à laisser librement passer les gaz utilisés par le procédé pour un contact adéquat avec les instruments à stériliser, et à constituer une protection de stérilité efficace. Des conteneurs rigides et différents matériaux d'emballage ont été évalués.

La cellulose absorbant de façon importante le peroxyde d'hydrogène, toute utilisation de papier ou dérivé comme moyen de conditionnement est contre-indiqué avec la stérilisation au HPGP. Il existe donc :

- des sachets et des gaines présentant une face en non-tissé polyéthylène traite et une face plastique transparente.
- des feuilles de stérilisation en non-tissé polypropylène
- des plateaux plastiques en polycarbonate/polystyrène.

5. Indicateurs biologiques

Les spores retenues sont celle de *Bacillus subtilis* variété niger. Les indicateurs se présentent sous forme d'un tube fermé d'un capuchon muni d'un filtre et contenant une ampoule scellée de catalase en poudre, une ampoule scellée de milieu de culture trypticase soja, une bandelette imprégnée de spores.

6. Indications

La stérilisation au HPGP permet la stérilisation de surface d'instruments thermo et hydrosensibles selon les matériaux entrant dans leur composition :

- plastiques (polychlorure de vinyle, polyéthylène, polypropylène, acétate de vinyle, polycarbonate, téflon),
- moteurs,

- silicone,
- métaux et alliages,
- "kraton ", nylon, polymétacrylate de méthyle, polyuréthane,
- latex,
- matériels électroniques,
- optiques et matériels d'optique.

7. Contre-indications

La stérilisation au HPGP est contre-indiquée avec certains composés en raison de l'impossibilité de réaliser certaines phases du cycle de stérilisation. Ce procédé de stérilisation est contre-indiqué avec :

- des liquides : impossibilité de réaliser un vide poussé en 20 minutes
- des mousses: impossibilité de réaliser un vide car trop grande quantité d'air.
- la cellulose et ses dérivés (linge, papier, tissus, étiquettes, champs opératoires, essuie-mains, compresses, feuille de stérilisation contenant de la cellulose) : absorbent le peroxyde d'hydrogène d'où une sous-pression lors des phases d'injection et de diffusion.
- la visqueuse : absorbe le peroxyde d'hydrogène,
- les articles en conteneurs métalliques : incidents en phase plasma,
- l'aolystyrène expansé : risque de désagrégation dans la chambre,
- les articles en plastique dont la lumière interne a un diamètre inférieur à 1millimètres ou une longueur supérieure à 2 mètres

8. Discussion

Ce procédé de stérilisation n'exige pas de local protégé comme dans le cas de la stérilisation par oxyde éthylène. L'absence de risque toxicologique est équivalente à

celle de la stérilisation à la vapeur. Ce procédé n'est donc à priori ni polluant pour le personnel, ni dangereux pour le patient. Il n'existe pas de risque d'implosion, les résidus formés en fin de cycle sont non toxiques et il n'existe pas d'émissions dangereuses.

En ce qui concerne l'efficacité du procédé vis à vis du prion, aucune validation à ce jour n'est parue. Par conséquent, un tri des instruments stérilisés par ces procédés doit être effectué, afin d'écarter tout instrument utilisé dans le cadre d'une intervention à risque.

Le peroxyde d'hydrogène étant un oxydant puissant, il est facile de comprendre que ce procédé de stérilisation peut oxyder la surface d'implants biomédicaux tels que ceux constitués de polyéthylène (32-36). Il est également rapporté que la stérilisation au HPGP augmente l'adhésion bactérienne sur du matériel de polyéthylène, davantage que la stérilisation l'EO (32).

III. Analyse de la composition chimique de surface par spectroscopie photo-électronique à rayons X (XPS)

1. Introduction

La spectrométrie photoélectronique X, ou spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS *X-ray photoelectron spectrometry*) est une méthode physique d'analyse chimique de surface mise au point à l'université d'Uppsala (Suède) dans les années 1960, sous la direction de Kai Siegbahn, ce qui lui a valu le prix Nobel en 1981.

2. Principe

Lors de l'analyse de surface XPS, l'échantillon est irradié par des rayons X monochromatiques qui provoquent l'ionisation de ses atomes par effet photoélectrique.

(figure 1) L'énergie cinétique E_c de ces photoélectrons est mesurée, ce qui donne le spectre de l'intensité des électrons en fonction de l'énergie mesurée.

Chaque photon X incident a la même énergie $h \cdot \nu$, puisque le faisceau est monochromatique (h étant la constante de Planck et ν la fréquence de l'onde lumineuse incidente). Lors de l'interaction avec l'atome, une partie de cette énergie sert à rompre la liaison, c'est l'énergie de liaison, E_L ; le reste est transféré à l'électron sous la forme d'énergie cinétique. Le spectre en énergie cinétique présente donc des pics, et l'on peut déterminer l'énergie de liaison correspondant à chaque pic par la relation d'Einstein :

| | | | | |
|---------------------------|-------|---|--------------------------------|--|
| | E_L | = | Énergie de liaison | [J] |
| | E_c | = | Énergie cinétique électronique | [J] |
| | h | = | Constante de Planck | [J s] ($\sim 6,626\ 0\ 755 \times 10^{-34}$) |
| | ν | = | Fréquence de radiation | [s ⁻¹] |
| $E_L = h \cdot \nu - E_c$ | | | | |

L'énergie du photon X incident est de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation des électrons de cœur : leur émission donne les pics XPS essentiellement caractéristiques, donc de la nature de l'atome ; alors que l'information chimique (surtout le degré d'oxydation) est tirée des petits déplacements du pic XPS correspondant à la variation d'énergie entre couches de valence. Cette dernière (correspondant aux domaines de l'UV/visible/proche de l'IR en général) est faible devant celle des rayons X.

On a finalement accès à la composition chimique de la surface du matériau analysé sur une profondeur de 10 nanomètres environ, par comparaison avec des spectres connus. Des analyses semi-quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur l'intégrale des pics.

En XPS, l'échantillon est illuminé par un faisceau de rayons X mous (1.5 kV) dans une enceinte à vide. On utilise un spectromètre à rayons-beta afin de déterminer les énergies des photoélectrons produits par l'effet photoélectrique.

Si on considère un atome isolé qui est sur le point d'être ionisé par un photon-X, l'énergie totale est $h\nu + E_i$, où $h\nu$ est l'énergie du photon et E_i l'énergie de l'atome dans son état initial.

Suite à l'absorption du photon et à l'émission du photoélectron, l'énergie totale est maintenant $EC + E_f$, où EC est l'énergie cinétique de l'électron et E_f l'énergie de l'atome (maintenant un ion) dans son état final. Parce que l'énergie totale est conservée :

$$h\nu + E_i = EC + E_f \text{ ou } h\nu - EC = E_f - E_i = EL$$

où l'énergie de liaison (EL) de l'orbitale d'où l'électron est éjecté est la différence entre l'énergie photonique (que l'on connaît) et l'énergie électronique (que l'on mesure) . On peut voir que cette énergie de liaison est déterminée par la différence entre l'énergie totale de l'atome à son état initial et de l'ion à son état final. Cette différence est approximativement égale à l'énergie Hartree-Fock de l'orbitale. Alors, les pics dans le spectre photoélectronique peuvent être identifiés à des atomes spécifiques. Donc, une analyse quantitative de la composition de la surface peut être effectuée.

La mesure des surfaces des pics photo-électroniques permet la détermination de la composition chimique de la surface. (figure 2 et table 1)

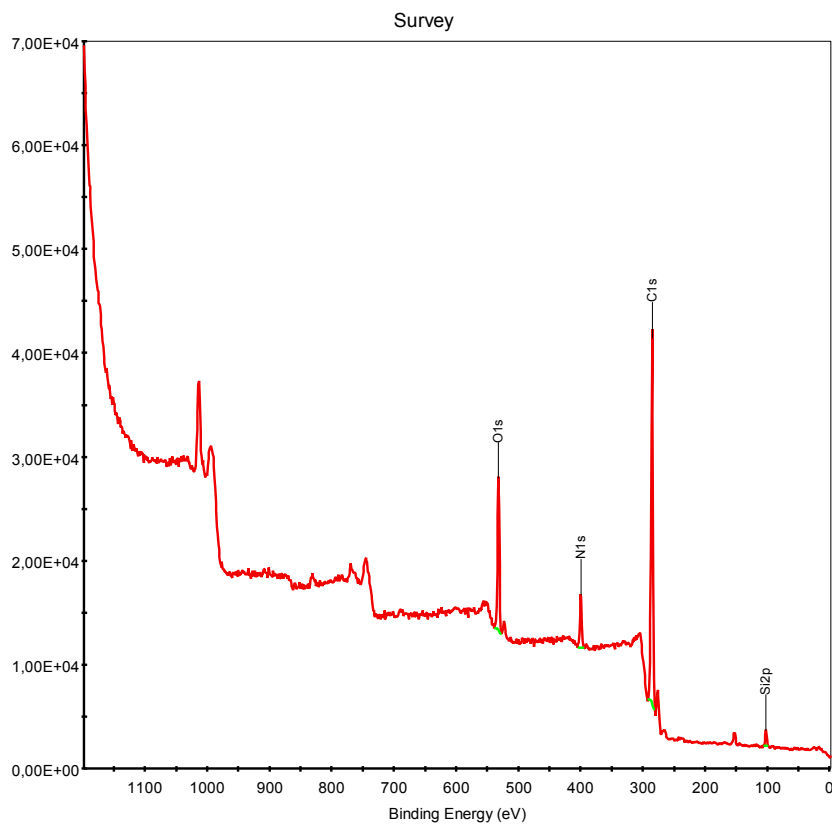


Figure 2 - Exemple d'un spectre de composition chimique de surface de fil de nylon : a chaque pic correspond un élément chimique constitutif de la surface de l'implant étudié.

| Name | Peak BE | Height Counts | FWHM eV | Area (P) CPS.eV | Area (N) | At. % |
|------|------------|------------------|------------|--------------------|-------------|----------|
| Si2p | 102.05 | 1257.29 | 3.46 | 4674.20 | 51.02 | 2.33 |
| C1s | 285.09 | 30172.92 | 3.68 | 130571.49 | 1678.25 | 76.53 |
| N1s | 399.85 | 4412.53 | 3.46 | 18100.60 | 147.49 | 6.73 |
| O1s | 531.95 | 12844.02 | 3.87 | 56069.52 | 316.24 | 14.42 |

Table I - Exemple de composition chimique de surface d'un fil de nylon déterminée par XPS.

Les électrons sont fortement absorbés par le matériau en sortant et c'est uniquement ceux dont l'origine se trouve très près de la surface qui arrivent à échapper sans perte d'énergie. La profondeur sondée par l'XPS est alors de quelques nanomètres seulement.

La liaison chimique aura une influence sur l'énergie atomique à l'état initial et l'énergie finale de l'ion créé par l'émission du photoélectron. On sait calculer par la mécanique quantique l'effet de la formation des liaisons sur l'énergie initiale. Cet effet est dû, essentiellement, à la redistribution d'électrons quand les atomes d'une molécule ou d'un cristal s'agglomèrent à l'état solide. Il dépendra principalement de l'électronégativité des atomes impliqués.

La création de l'ion par photoémission causera une redistribution additionnelle des électrons entourant l'atome cible et ceci aura un impact sur l'énergie à l'état final. Ce processus, que l'on appelle relaxation électronique, a un composant intra-atomique et un composant extra-atomique, et il sera dominé par les polarisabilités des atomes impliqués.

Ainsi, la présence des liaisons chimiques (et donc d'atomes avoisinants) causera des déplacements d'énergie de liaison, que l'on peut utiliser afin de dériver de l'information chimique de la surface de l'échantillon, sur les états d'oxydation par exemple. Pour cette raison, l'XPS est aussi connu sous le nom "Spectroscopie électronique pour l'analyse chimique" (ESCA).

3. Indications

La méthode d'analyse XPS est connue pour sa nature faiblement (habituellement non-) destructrice et pour sa capacité d'analyser presque n'importe quel matériau solide (métal, céramique ou polymère). Il a bien sûr quelques inconvénients - une limite de

détection de $\sim 1\%$, et un manque de résolution spatiale. Cependant, cet instrument est capable de cibler des surfaces aussi petites que 20 microns de diamètre. La méthode d'analyse XPS est, avec la méthode d'analyse TOF-SIMS (*Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*), essentielle à l'analyse de surface. Par sa simplicité d'utilisation et d'interprétation, la méthode XPS est probablement la plus répandue et utilisée pour l'analyse de surface de polymères. Elle permet de quantifier les éléments chimiques présents à la surface du polymère mais également de nous renseigner sur les liaisons chimiques. Toutefois, les informations moléculaires et de résolution spatiale sont limitées avec cette méthode d'analyse. La méthode TOF-SIMS offre la combinaison d'une spécificité moléculaire élevée et d'une résolution spatiale très fine permettant de déterminer avec précision la chimie de surface du polymère. Cette technique est également la seule qui permette d'obtenir la composition et la morphologie du polymère étudié en même temps. Cependant, la méthode TOF-SIMS ne permet pas facilement de générer des données quantitatives, contrairement à la méthode XPS.

4. Discussion

La composition chimique de surface peut influencer le comportement des cellules et des protéines adhérentes qui vont avoir une incidence directe sur l'intégration de l'implant ou la réaction associée à la mise en place d'un implant médical (37-42).

Des résultats d'études précédentes ont clairement démontré que des procédés de stérilisation pouvaient altérer les propriétés physiques de surface de matériels médicaux particulièrement ceux constitués de polymères divers (43-46).

Le plasma de gaz est connu pour sa capacité à modifier la surface de solide et est couramment utilisé dans l'industrie pour le traitement et la modification de surface de polymères et de conducteurs (47). Par exemple, des plasmas contenant de l'oxygène

sont utilisés pour oxyder la surface de polymères afin d'améliorer leur degré de mouillage et leur propriété d'adhésion (47,48). L'agent chimique utilisé lors de la stérilisation au HPGH, l'hydrogène peroxyde, est connu pour être un oxydant très fort (33-35). Il est alors facile de comprendre que son utilisation pourrait facilement induire une oxydation de surface de polymères, et pourrait potentiellement laisser des agents toxiques ou des résidus sur la surface de matériaux stérilisés. L'oxydation de surface d'implants par la stérilisation au HPGP peut intervenir lors de trois phases : lors de l'exposition directe à la vapeur d' H_2O_2 lors de la phase chimique de la stérilisation au HPGP (32-35), lors de l'exposition à des réactifs issus de la phase de plasma elle-même (47,48), et après la stérilisation lorsque des radicaux libres générés sur la surface des polymères lors de la phase de plasma peuvent réagir avec l'oxygène de l'atmosphère (47-49). L'oxydation de surface de matériel de polyéthylène est également considérée comme un responsable majeur d'inflammation, de réaction de corps étranger et d'échec d'implantation de implant médicaux (50,51).

Une étude récente portant sur l'analyse de surface de poly(L)-lactide n'a pas démontré de modification chimique significative suite à la stérilisation au HPGP et à l'EO et conclue que la stérilisation au HPGP pouvait être envisagée pour les implants en poly(L)-lactide (19). Cependant, une précédente étude rapporte que la stérilisation au HPGP pourrait altérer la surface de matériel constitué de polyéthylène (32). Il a également été rapporté que la stérilisation au HPGP entraînerait la présence de résidus de peroxyde d'hydrogène à la surface de certains polymères suite au processus de stérilisation (20,32,52).

De précédentes études ont aussi démontré que le type de matériel, son épaisseur, la température et le temps de contact notamment avec l'EO constituent des facteurs critiques déterminant les taux de résidus d'EO sur les implants stérilisés (53-58). Il a

ainsi été rapporté une légère oxydation de surface d'implants constitués de polyéthylène et stérilisés à l'EO (43). Il a également été rapporté récemment que la stérilisation au HPGP n'altérerait pas la composition chimique du polyéthylène (32).

IV. Evaluation de la mouillabilité de surface par goniométrie

1. Introduction

Le mouillage d'un liquide sur un solide désigne d'une part la forme que prend le liquide à la surface du solide (mouillage statique) et la façon dont il se comporte lorsqu'on essaie de le faire couler (hystérèse, ancrage, mouillage dynamique). La mesure de l'angle de contact par goniométrie va rendre compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité.

2. Principe

La qualité du mouillage d'un liquide sur un solide est le degré d'étalement du liquide sur ce solide. On parle de mouillage total lorsque le liquide s'étale totalement, et de mouillage partiel lorsque le liquide forme une goutte sur le solide. Le type de mouillage (total ou partiel) est déterminé par le signe du coefficient d'étalement.

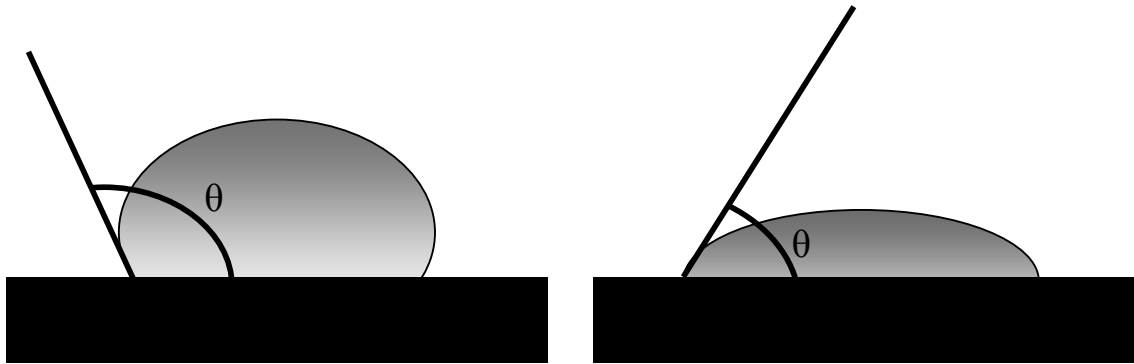


Figure 3 - Forme d'une goutte déposée sur la surface d'un matériel quelconque : l'angle de contact, noté θ sur la figure ci-dessous permet de quantifier la qualité du mouillage.

La méthode de mesure de l'angle de contact consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle peut permettre également d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact (θ).

La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :

- Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.

- Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui de Owens Wendt.
- Si on mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

En pratique, une goutte de liquide, en général de l'eau ultra-pure, est déposée à l'aide d'une seringue sur la surface de l'échantillon à analyser. La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un ordinateur via une caméra. Un logiciel permet de numériser le contour de la goutte par traitement des images. Il détermine ensuite l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation.

Mouillage total

Lorsque le coefficient d'étalement est positif ($S > 0$), la situation du solide mouillé est plus favorable que la situation du solide sec. Ainsi, le liquide s'étale jusqu'à former un film. On parle de mouillage total. L'angle de contact est alors nul.

Mouillage partiel

À l'inverse, lorsque le coefficient d'étalement est négatif ($S < 0$), la situation du solide sec est plus favorable que la situation du solide mouillé. Ainsi, le liquide se rétracte et forme une goutte. On parle de mouillage partiel. L'angle de contact résulte alors de l'équilibre des tensions de surfaces et est donné par la loi de Young-Dupré.

Mouillage nul

La limite où l'angle de contact est égal à 180 degrés est appelée mouillage nul. Ainsi, une surface chaude permet d'obtenir un mouillage nul. On parle alors de caléfaction. Il est possible de s'approcher de telles surfaces grâce à la superhydrophobie (l'angle de contact est alors supérieur à 150 degrés). L'effet lotus est un exemple concret

permettant de fabriquer des surfaces superhydrophobes grâce à une nanostructuration de la surface.

L'erreur associée à l'utilisation d'un goniomètre de contact peut être significative lorsqu'une méthode de mesure standard est utilisée et elle dépend de l'expérience du manipulateur. Une instrumentation plus moderne utilisée de nos jours permet de digitaliser et numériser le profil de la goutte en intégrant l'équation de Young-Laplace afin de générer la meilleure courbe. Cette méthode est versatile, répétable, rapide et précise pour déterminer l'angle de contact et la tension de surface d'un polymère. Toutefois elle présente également quelques inconvénients. Pour des goniomètres conventionnels, la détermination de l'angle de contact est dépendant du placement subjectif de deux lignes: une caractérisant le bord de la goutte et l'autre caractérisant le plan de contact entre la goutte et la surface du polymère. La reproductibilité de cette mesure dépend directement du placement de ces deux lignes. Avec des goniomètres numérisés, ces critères sont basés sur l'analyse de l'image de la goutte numérisée et la reproductibilité est donc meilleure. Des facteurs tels que l'intensité d'illumination, le focus, le contraste, l'indice de réfraction du polymère étudié peuvent affecter la mesure de l'angle de contact.

Pour de faibles angles de contact, la méthode de Wilhelmy est plus indiquée, puisque le paramètre mesuré dans cette méthode est une force, qui diminue lorsque l'angle de contact augmente. Cette méthode est libre de la subjectivité inhérente à la méthode de mesure par goniométrie. Toutefois cette méthode de mesure nécessite une préparation de l'échantillon qui doit présenter certaines spécificités. L'échantillon doit être d'une taille appropriée, avec une section transversale uniforme dans le sens de l'immersion, et une longueur mouillée connue.

3. Discussion

Il a été démontré que des modifications de propriété de surface telles que le mouillage, le degré d'hydrophobie ou encore l'énergie de surface affectent la quantité et le type de protéines adhérees à la surface de l'implant initialement mais également altèrent les propriétés d'adhésion bactérienne (19,20,53-63). Peu après l'implantation d'implant, leur surface est recouverte de protéines hôtes puis de cellules inflammatoires (64-67). Il est également généralement admis que la nature de ces protéines adsorbées ont un rôle essentiel à jouer dans les réactions immunitaires de l'hôte et l'un des objectifs du traitement de surface des implants est en fait la possibilité de contrôler la quantité, la nature voire les changements de conformation de ces protéines hôtes adhérant à la surface d'implants afin de limiter ou d'orienter les réactions immunitaires de l'hôte (64-68). En général, une surface hydrophile procure une interface d'énergie libre résultant en une diminution de l'adsorption de protéines et d'adhésion cellulaire (63,69-72). Il a également été suggéré que des surfaces hydrophiles entraînent une inhibition de l'adhésion des leucocytes et atténuent les réactions inflammatoires (73).

La stérilisation au HPGP pourrait entraîner des modifications de surface de polymères en polyéthylène en terme d'hydrophobicité et d'énergie de surface (19,59,74-77). Une étude récente rapporte que la stérilisation au HPGP et à l'EO augmentent l'hydrophobicité de la surface d'implant de polyéthylène (32). La stérilisation à la vapeur peut également modifier l'hydrophobicité de surface de certains implants biomédicaux (78).

Ensuite, l'oxydation de surface de polymère est généralement accompagnée d'une diminution de l'angle de contact. En effet, les produits de l'oxydation créés par le plasma sur la surface des polymères sont très polaires et donc augmente l'énergie libre de surface des polymères (32,79-81).

Enfin, de précédentes études suggèrent également que l'hydrophobicité de surface influence l'adhésion bactérienne initialement (82-84). Toutefois, l'influence de l'hydrophobicité de surface sur l'adhésion bactérienne est controversée et les résultats de nombreuses études sont inconsistants voire parfois contradictoires (85-90).

V. Evaluation de la rugosité de surface par microscopie à force atomique

1. Introduction

Cette technique a été développée pour la première fois en 1986 par les chercheurs Binning, Quate et Gerber en collaboration avec la multinationale américaine IBM (*International Business Machine Corporation*) et l'Université de Stanford en Californie. Le microscope à force atomique (AFM *atomic force microscopy*) est un type de microscope à sonde locale qui sert à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie la surface à représenter, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétroaction. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface.

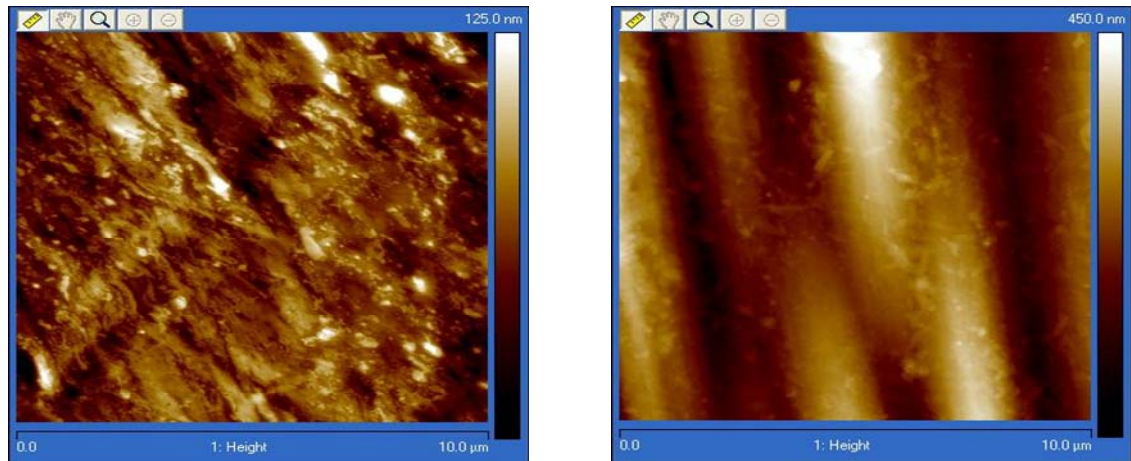


Figure 4 – Topographie de surface d'un fil de nylon leader obtenue au microscope à force atomique : à gauche, non stérilisé ; à droite, stérilisé à l'EO.

2. Interactions et modes d'utilisation

Les atomes ont souvent tendance à s'attirer ; lorsque l'affinité des atomes est grande, ils se lient pour former une molécule ou un cristal, mais dans la plupart des cas, cette attraction est très faible et n'est perceptible qu'à très faible distance (il s'agit de forces de Van der Waals). À l'inverse, lorsqu'ils sont très proches, les atomes se repoussent du fait de la soumission des électrons du cortège électronique à la répulsion électrostatique. Il y aura donc une sorte de « distance d'équilibre » : si les atomes s'éloignent, une force les rappelle, et s'ils se rapprochent, une force les repousse.

On utilise donc cette attraction/répulsion entre les atomes surfaciques et la pointe sondeuse. La pointe est montée sur un levier très flexible ; la mesure de la flexion du levier (dans un sens ou dans l'autre) donne une mesure directe de la force d'interaction entre la surface sondée et la pointe.

Il existe plusieurs modes d'utilisation de l'AFM que l'on peut regrouper en 2 catégories: le mode contact (statique), et les modes dynamiques: modulation d'amplitude (souvent appelé contact intermittent ou "*tapping*" où la pointe n'est pas toujours en

contact avec l'échantillon) et modulation de fréquence (nom historique non-contact résonant, ou *near contact* résonant, où la pointe peut indenter le matériau).

Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation.

Le mode modulation d'amplitude dit "*tapping*", de loin le plus utilisé, consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.

Le mode modulation de fréquence a été initialement utilisé avec en moyenne des forces attractives, avec des exemples de résolution atomique. Plus délicat à gérer, il permet contrairement au mode modulation d'amplitude de séparer directement l'effet des forces conservatives et dissipatives. Il est essentiellement utilisé sous vide. La rétroaction s'effectue soit sur la déviation de la fréquence de résonance.

Mesure de la déviation du levier

Il existe plusieurs façons de mesurer la déviation du levier. La plus courante, et de loin, est la mesure via réflexion d'un laser.

La pointe est alors montée sur un levier réfléchissant. Un rayon laser se réfléchit sur le levier. Si le rayon laser dévie, c'est que le levier s'est infléchi (dans un sens ou dans l'autre), et donc est révélateur des forces d'interactions entre la pointe et la surface. La mesure de la déviation de la pointe passe donc par celle de la position du faisceau laser réfléchi, ce qui s'effectue au moyen d'un quadrant de photodiodes - c'est-à-dire une photodiode circulaire divisée en quatre parts égales, selon deux diamètres.

Quand le faisceau n'est pas dévié, il frappe au centre du quadrant, et donc illumine également les 4 photodiodes. Si le faisceau laser vient à être dévié vers le haut, les deux photodiodes du haut recevront plus de lumière que celles du bas, et il apparaît donc une différence de tension. C'est cette différence de tension que l'on utilise pour la rétroaction.

L'intérêt de la mesure par laser est essentiellement la facilité de mise en œuvre, mais elle permet aussi d'accéder à une mesure secondaire qui est celle de la friction. En effet, la pointe balaie la surface à une certaine vitesse ; à partir du moment où elle est en contact, ceci génère des frottements, et donc infléchit le levier autour de son axe. Cette déviation implique une différence de tension non plus entre le haut et le bas du quadrant, mais entre la droite et la gauche. On peut ainsi avoir accès aux forces de frottement existant entre la pointe et la surface, et donc de façon qualitative à la nature chimique de la surface.

Résolution

La résolution de l'appareil correspond essentiellement à la dimension du sommet de la pointe (le rayon de courbure). Mis à part le mode non-contact, dont on a déjà souligné la difficulté de mise en pratique, l'AFM utilise des forces répulsives, c'est-à-dire du contact. Il en résulte que les pointes trop fines s'usent rapidement - sans compter la détérioration de la surface. C'est là tout l'intérêt du mode *tapping* : puisque le contact est intermittent, les pointes s'usent moins vite, et on peut donc utiliser des pointes très fines (de l'ordre d'une dizaine de nanomètres). La résolution latérale est de l'ordre de la dizaine de nanomètres, mais la résolution verticale est par contre de l'ordre de l'Angström : on peut aisément visualiser des marches atomiques sur une surface propre. Enfin, la surface visualisable dépend de la céramique piézoélectrique utilisée, et peut aller de 100 nanomètres carrés à environ 150 micromètres carrés.

Pour déterminer si l'analyse d'un échantillon peut être réalisée par AFM, il y a des avantages et des inconvénients qui doivent être considérés. Contrairement à la microscopie électronique qui permet une projection à deux dimensions ou une image à deux dimensions d'un échantillon, l'AFM fournit un profil de surface en trois dimensions. En outre, des échantillons observés par AFM ne nécessitent pas de traitements spéciaux qui peuvent modifier de manière irréversible ou endommager la surface de l'échantillon. Contrairement à la plupart des microscopes électroniques, la plupart des AFM peuvent fonctionner parfaitement sous air ambiant ou même en milieu liquide, permettant ainsi d'étudier des macromolécules biologiques et même des organismes vivants. En principe, l'AFM peut également fournir une résolution supérieure à la microscopie électronique.

Un des inconvénients de l'AFM par rapport à la microscopie électronique à balayage (MEB) est l'obtention d'une taille d'image limitée. En un seul passage, le MEB peut imager une zone de l'ordre de carrés millimètres avec une profondeur de champ de l'ordre de quelques millimètres alors que l'AFM ne peut imager qu'une hauteur maximale de l'ordre de 10-20 micromètres et qu'une superficie maximale de balayage d'environ 150×150 micromètres. La vitesse de numérisation d'un AFM est également une limitation. Traditionnellement, l'AFM ne peut pas analyser les images aussi vite que le MEB, nécessitant plusieurs minutes pour un balayage typique, tandis qu'un MEB est capable de numériser une surface en temps quasi réel, mais avec une qualité relativement faible comparée à l'AFM.

L'AFM peut également être affectée par l'hystérésis du matériau piézo-électrique et de la diaphonie entre les x , y , z axes qui peuvent nécessiter l'amélioration du logiciel et de filtrage. Un tel filtrage peut "lisser" les véritables caractéristiques

topographiques. Néanmoins, les nouveaux scanners utilisant l'AFM permettent de limiter ces problèmes d'hystérésis et de diaphonie.

Enfin, comme pour toute autre technique d'imagerie, des artéfacts d'image peuvent survenir. Une pointe inadaptée, un mauvais environnement de fonctionnement, ou l'échantillon lui-même

3. Discussion

La rugosité de surface est souvent caractérisée par une valeur Ra (qui est la moyenne arithmétique de la déviation de la hauteur du profil de surface) ou la valeur de rugosité RMS (pour *root-mean-square*) obtenue à partir d'une aire définie sur une image obtenue à l'AFM. L'influence de la rugosité sur l'adhésion bactérienne est encore incertaine (91-93). Il a été rapporté que des surfaces avec une rugosité plus élevée favorisait l'adhésion bactérienne (94,95). Cependant, d'autres études ont démontré que la rugosité de surface n'influençait pas ou peu l'adhésion bactérienne et qu'une réduction de la rugosité en dessous d'un $Ra < 0.2 \text{ mm}$ n'avait pas d'effet sur l'adhésion et la colonisation bactérienne (96,97). Il est facile de comprendre qu'une surface plus rugueuse entraîne une adhésion bactérienne plus conséquente par des forces de frottements et une surface de contact plus importantes (94,95,98-100). Cependant, il a été suggéré qu'à partir d'une certaine valeur de rugosité, il n'y avait pas de corrélation entre la rugosité et l'adhésion bactérienne ($Ra = 200\text{nm}$ or $0.2\mu\text{m}$) (92,101,102). Une étude a notamment rapporté que la rugosité de surface du titane n'affectait pas l'adhésion bactérienne de *Staphylococcus epidermis* (103).

Il est aussi rapporté que la rugosité de surface prédomine sur l'hydrophobicité (101,104), et qu'une augmentation de la rugosité est rapportée comme augmentant également l'hydrophobicité d'un matériel donné (32,105).

Toutefois, l'énergie de surface semble être un facteur plus important que la rugosité de surface pour l'adhésion et la prolifération cellulaire (106).

Il est enfin rapporté que le procédé de stérilisation et notamment la stérilisation à l'EO ou au HPGP, peut augmenter la rugosité de surface de polymères tels que le polyéthylène ou le polyvinylchloride (32,36). Les effets de la stérilisation à l'EO sur la rugosité de polymères de poly(L-lactide) ont précédemment été étudiés (75) ; et une augmentation de la rugosité de surface de matrices ou « scaffolds » est également rapportée après la stérilisation à l'EO (107).

VI. Evaluation de l'adhésion bactérienne de surface

1. Introduction

L'adhésion bactérienne et la formation d'un biofilm sur la surface d'un implant peuvent varier dépendamment de l'espèce et du nombre de bactéries, de la nature de l'implant et de ses caractéristiques physiques et électro-chimiques de surface (108-113). L'adhésion et la colonisation bactérienne sur la surface d'implants peuvent causer une infection et conséquemment un échec de leur implantation (114). Il a aussi clairement été démontré que la présence de matériel de suture proche d'une plaie augmentait la susceptibilité du tissu hôte aux infections (115). *Staphylococcus epidermis* et *Staphylococcus aureus* sont les pathogènes les plus fréquents lors d'infection associées à des implants orthopédiques (116,117). Il a été démontré que *Staphylococcus aureus* adhère plus facilement sur les métaux, et que *Staphylococcus epidermidis* adhère plus facilement sur la surface de polymères, tel que ceux constitués de polyéthylène (118,119). *Staphylococcus aureus* est ainsi davantage mis en cause lors d'infection

d'implants métallique et *Staphylococcus epidermidis* plus fréquemment rencontrés lors d'infection de polymères (120,121).

2. Adhésion bactérienne – Principe

L'adhésion bactérienne sur une surface est sélective et dépend des interactions spécifiques entre la surface du matériel, la bactérie et l'hôte (121). Il a été clairement démontré que l'affinité d'une bactérie pouvait varier en fonction du type de suture et inversement (121). La paroi d'une bactérie gram-positive telle que *Staphylococcus aureus*, est constituée d'une seule couche rigide de peptidoglycan, alors que la paroi d'une bactérie gram-négative telle que *Escherichia coli*, est constituée de multiples couches de lipopolysaccharides et de protéines. Des observations au microscope électronique ont également démontrés que *Staphylococcus aureus* adhéraient en amas alors que *Escherichia coli* adhéraient davantage de manière individuelle initialement (121). Il est alors facile de comprendre qu'une bactérie avec un comportement, une constitution et une composition de paroi propre présentera une affinité ou une capacité d'adhésion qui lui est propre et qui sera différente d'une autre bactérie pour un type de matériel ou de suture donné (121).

L'adhésion bactérienne comprend quatre phases :

- le transport de la bactérie à la surface de l'implant,
- une interaction de surface initiale, avec une phase réversible puis irréversible,
- l'adhésion propre par la mise en place d'interactions spécifiques,
- et finalement la colonisation et la formation d'un biofilm (122-124).

De nombreuses méthodes de dénombrement ou de comptage de colonies ou de bactéries sont utilisés et le simple comptage du nombre de colonies bactériennes présentent à la surface des géloses est couramment utilisés (32,101,103,120,121,125-

127). La technique de comptage du nombre de colonies bactériennes sur gélose consiste à compter chaque colonie qui s'est développée après la période d'incubation (temps) à la surface de la gélose. Ce comptage, en prenant en compte le facteur de dilution de la solution contenant les bactéries et étalée au préalable à la surface de la gélose, nous permet de déterminer le CFUs (*colony forming units*) de la solution initiale.

Un inconvénient majeur de cette méthode est la supposition que chaque colonie provient d'une seule bactérie. Certaines espèces bactériennes telles que *Staphylococcus* croissent en amas, chaque amas est donc compté comme une seule colonie. C'est pour cela que le terme CFU est utilisé et non « nombre de bactérie ». Une attention particulière doit également être observée lorsque les différentes dilutions sont réalisées et lors de l'étalement sur gélose afin d'éviter les erreurs de manipulations. Le temps et la température d'incubation et les conditions du milieu de culture sont également des facteurs importants dans l'obtention d'un CFU interprétable. Malgré ces inconvénients, cette technique demeure très populaire, est assez sensible et permet de compter seulement les bactéries viables.

D'autres techniques de comptage bactérien (direct ou indirect) sont également disponibles. Le comptage bactérien peut être effectué par l'utilisation d'une chambre de comptage électronique (ne permet pas la distinction entre les bactéries viables/bactéries mortes), par mesure de la turbidité du milieu de culture, ou encore par mesure du taux protéique ou de l'activité biochimique (absorption d'O₂, production de CO₂ ou d'ATP...). Des techniques intéressantes telles que la microscopie par fluorescence associée au marquage d'acides nucléiques sont également de plus en plus utilisées de nos jours, permettant un gain de temps dans les manipulations et la distinction des bactéries viables des bactéries mortes (32,101,103,120,121,125-127).

3. Discussion

L'adhésion bactérienne et la colonisation de surface d'implants sont ainsi des processus compliqués, dépendant de nombreux facteurs, de la bactérie elle-même, mais également de la composition chimique, de l'hydrophobicité et de la rugosité de surface (91,101,122,124,127-130). D'autres facteurs peuvent influencer l'adhésion bactérienne initiale *in vitro* sur des surfaces de polymère tel que le milieu de culture, les conditions de culture et d'incubation des bactéries, le temps d'incubation et la phase de croissance de la bactérie (124,125,131). L'adhésion bactérienne *in vitro* peut ainsi ne pas corrélérer à celle *in vivo* (125).

En général, l'adhésion bactérienne est diminuée lorsque la rugosité et l'énergie de surface diminue, où que l'angle de contact augmente (126,127). Il est également admis que l'hydrophobicité de surface et la rugosité gouvernent l'adhésion bactérienne initialement (94,100). Des études ont ainsi rapportés qu'une augmentation de l'hydrophobicité de surface pouvait réduire l'adhésion bactérienne (98,100,101). Bien que la rugosité de surface influence l'adhésion bactérienne sur des surfaces d'implants métalliques, ce facteur est moins important pour d'autres polymères (32). Une étude précédente a notamment rapporté que la rugosité de surface de polymères de polyéthylène n'affectait pas significativement l'adhésion bactérienne lors de stérilisation au HPGP (32). Il a également été rapporté que la stérilisation à l'EO pouvait être plus efficace que la stérilisation au HPGP dans la prévention de l'adhésion bactérienne sur la surface d'implant de polyéthylène (32).

ETUDE EXPERIMENTALE

**Physicochemical and bioadhesive evaluation of hydrogen
peroxyde gas plasma sterilization of nylon and polyethylene lines
used for stabilization of the canine stifle joint**

Matthieu GATINEAU⁽¹⁾, DMV, IPSAV, **Alexander O. EL-WARRAK⁽¹⁾**, DMV, MSc,
PhD, **Rodrigo FRANCA⁽²⁾**, PhD, **Christian BOLLIGER⁽¹⁾**, Dr.med.vet., DACVS, DECVS
Michael MOUREZ⁽¹⁾, PhD, **Marie ARCHAMBAULT⁽¹⁾**, MSc, PhD, DACVM, **Guy**
BEAUCHAMP⁽¹⁾, PhD

(1) Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada

(2) Biomechanical Engineering Institute, Ecole polytechnique, Quebec, Canada

Poster accepté au congrès au symposium 2011 de l'ACVS (American College of Veterinary Surgeons), Chicago, 3-5 Novembre, Chicago, USA

**Physicochemical evaluation of hydrogen peroxyde gas plasma
sterilization of nylon and polyethylene lines used for stabilization
of the canine stifle joint**

Matthieu GATINEAU⁽¹⁾, DMV, IPSAV, **Alexander O. EL-WARRAK⁽¹⁾**, DMV,
MSc, PhD, **Rodrigo FRANCA⁽²⁾**, PhD, **Christian BOLLIGER⁽¹⁾**, Dr.med.vet.,
DACVS, DECVS

(1) Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada

(2) Biomechanical Engineering Institute, Ecole polytechnique, Quebec, Canada

Article soumis au journal ***Biomaterials***

SHORT ABSTRACT

Objective— To compare the effects of hydrogen peroxide gas plasma (HPGP), ethylene oxide (EO) and steam (ST) sterilizations on the chemico-physical properties of nylon and polyethylene sutures used for stabilization of the canine stifle joint.

Study Design—In vitro study.

Samples—Non-sterilized, HPGP-, EO- and ST- sterilized samples of 36.3-kg test nylon leader line (NLL), 57.8-kg test nylon fishing line (NFL) and 2-mm Ultra High Molecular Weight Polyethylene suture (UHMPE) were used.

Methods—Surface analysis of NLL, NFL and UHMPE non-sterilized and HPGP-, EO- and ST-sterilized samples was carried out to obtain surface chemical composition by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), to determine surface wettability by contact angle (CA) measurement, and to assess roughness by atomic force microscopy (AFM).

Results—Surface oxidation was only observed on ST-sterilized NFL. All sterilization methods significantly increased the CA for the NLL, NFL and UHMPE. The roughness was not significantly affected by the method of sterilization for NLL, NFL and UHMPE. UHMPE had significantly higher CA and roughness compared to NLL and NFL, no matter which sterilization method was used.

Conclusion—The effects of HPGP on the chemico-physical properties of nylon and polyethylene lines compared positively to EO or ST, making HPGP an attractive alternative for sterilization of nylon and polyethylene lines used for stabilization of the canine stifle joint. NLL or NFL may be a more suitable material compared to UHMPE for suture prostheses regarding wettability and roughness properties. However, further studies need to be conducted before any recommendations could be made.

Introduction

Rupture of the cranial cruciate ligament is one of the most commonly diagnosed canine orthopedic conditions leading to patient morbidity, reduced activity, and progressive degenerative joint disease (1,2). The most accepted treatment for this condition is surgical stabilization of the stifle. One current surgical technique is the extra-articular stabilization using a lateral suture (LS) with a biocompatible prosthetic suture (3,4). Despite the good clinical outcome with this procedure there are few complications such as bacterial contamination of implant surfaces during surgery. This contamination is the primary cause of implant-related infections (5). Important factors that influence bacterial adhesion over an implant are its physicochemical and bioadhesive properties (6-9). Results of previous studies clearly demonstrated that sterilization can affect the surface properties of polymers (10-13). However, to the author's knowledge, no studies have been published that evaluate the physicochemical and bioadhesive properties on LS materials used in veterinary surgery.

Compared to steam (ST) sterilization, ethylene oxide (EO) has found to have the least detrimental effects on the mechanical characteristic of LS material (4,14,15). However, some human and animal studies suggest that ethylene oxide could be carcinogenic and associated with breast and other form of cancers in those exposed to it (16-18). In addition, EO residuals and their toxic effect, adhered to a surgical implant has to be taken into consideration (19-23). Furthermore several countries have introduced strict regulations for the use of EO which favors the sterilization with hydrogen peroxide gas plasma (HPGP) (24).

Hydrogen peroxide gas plasma sterilization is based on the synergism between hydrogen peroxide and low temperature gas plasma. Toxic residues or emissions have not been reported; thus aeration, ventilation, and other special procedures are not

required (25). System by-products are oxygen and water vapor, and operators do not come in contact with hazardous materials. However, many questions still remain open with regards to its efficacy and potential hazards from the sterilized materials. According to the suppliers, HPGP sterilizers have a wide compatibility of materials. However, surface modification of biomedical devices, particularly those including polymers, sterilized by plasma-based systems is practically assured and gas plasma is well known for its ability to modify solid surfaces, via etching, deposition and surface modification reactions (28). For instance, oxygen-containing plasmas are used to oxidize polymeric surfaces as well as to enhance their wettability and adhesion properties (28,29). Moreover, the agent used during the chemical phase of HPGP sterilization, hydrogen peroxide, is known to be a strong oxidizer (30-32). A recent study reported, that HPGP sterilization compared favorably to EO sterilization in regards to the mechanical properties of nylon lines used for surgical procedures (33).

The main goal of this study was to compare the effect of HPGP, EO and ST sterilization methods on physicochemical properties of currently used implants for extra-articular stabilization of cranial cruciate ligament deficient stifle joint in dogs. We hypothesized that HPGP sterilization would perform as well as EO or ST sterilization.

Material and Methods

Samples from nylon leader line (NLL), nylon fishing line (NFL) and Ultra High Molecular Weight Polyethylene suture (UHMPE) which are frequently used in small animal orthopedic procedures were chosen for this study. Samples of 36.3-kg [80lb] test monofilament nylon leader line (NLL) (Mason Hard Type Leader Material, Mason Tackle Company, Otisville, MI, USA), of 57.8-kg [127.4lb] test monofilament nylon fishing line (NFL) (Tortue La Soie-Neyme SA, Boulogne, France), and of 2-mm Ultra

High Molecular Weight Polyethylene (UHMPE) (Fibertape 2mm, Arthrex SAS, Lezennes, France) were used. HPGP sterilization was performed as recommended by the manufacturer for 28 minutes using a Sterrad[®] system. (ASP J&J Company Medical Products, Irvine, CA, USA) EO sterilization was performed as recommended by the manufacturer at 55°C and 56kPa using a 3M Steri-Vac[®] system. (3M Company, St Paul, MN, USA) and ST sterilization was performed as recommended by the manufacturer at - 121°C and 1.1bar using a Kwiklave[™] autoclave. After EO sterilization, a 12-24h aeration time was performed as recommended to remove any traces of this toxic chemical (34).

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), contact angle measurement (CA) and atomic force microscopy (AFM) techniques were used to examine possible modifications of the surface of NLL, NFL and UHMPE unsterilized, and HPGP-, EO- and ST-sterilized samples. Thus twelve groups were successively tested including unsterilized, HPGP-, EO- and ST-sterilized NLL samples; unsterilized, HPGP-, EO- and ST-sterilized NFL samples; and unsterilized, HPGP-, EO- and ST-sterilized UHMPE samples. For each group, 5 samples were examined.

The chemical composition of the suture surface was studied by XPS in a VG ESCALAB 3MkII system (Thermo VG scientific, West Sussex, UK), using Mg K_α radiation. For each group, 5 samples were assessed.

The wettability was assessed by measuring the contact angle with a VCA Optima System (AST Products, Inc, Billerica, MA, USA) using de-ionized water as a liquid at room temperature. A sessile drop of 0.5μL of water was dispensed on the surface of each sample (NLL, NFL, UHMPE non-sterilized and sterilized). Five samples per group were examined and the values are reported to the average of 3 measurements of each sample.

Finally, samples were measured for roughness using an AFM Dimension 3100 Nanoscope IIIA (Digital instruments, Santa Barbara, CA, USA) and topographic images were also recorded. For each group, 5 samples were assessed.

A two-way analysis of variance, with materials (NLL, NFL and UHMPE) and groups (control, HPGP, EO and ST) as main factors, and interaction between materials and groups, was used to examine the effect of sterilization methods on contact angle and roughness for each material type, and the effect of each material type on contact angle and roughness for each sterilization method. A post-hoc Tukey test was used to test differences between pairs of means. Version 9.1 of SAS (Cary, N.C.) was used for statistical analyses and a level of significance of 0.05 was applied throughout the study.

Results

XPS

The mean of the chemical components of the surface of each material is summarized in *Table 1*. No statistical analysis was performed as the VG ESCALAB 3MkII system provided the chemical surface composition directly as a mean for each group (5 samples assessed at the same time) without providing the standard deviation (SD) for each group.

For the HPGP sterilization, the atomic percentage of nitrogen mildly increased for UHMPE and NFL and mildly decreased for NLL compared to unsterilized samples; meaning that HPGP sterilization had a minor effect on UHMPE and NFL surface.

For the EO sterilization, the atomic percentage of nitrogen did not increase for UHMPE and NFL and only mildly increased for NLL compared to unsterilized samples; meaning that EO sterilization had a minor effect on NLL surface.

For the ST sterilization, the atomic percentage of nitrogen increased for UHMPE, NLL (twice the initial percentage for NLL) and NFL compared to unsterilized samples. Surface modification seemed more pronounced with ST sterilization compared to EO and HPGP sterilization.

The atomic percentage of carbon markedly increased and the atomic percentage of oxygen markedly decreased for NFL after ST sterilization; meaning that ST sterilization induced some degree of oxydation on NFL surface. The atomic percentage of C and O did not show major modification for HPGP-, EO- and ST-sterilized UHMPE and NLL and for HPGP- and EO-sterilized NFL compared to unsterilized samples.

The atomic percentage of silica of the UHMPE was markedly superior compared to NLL and NFL.

Sodium and chloride, which were present on all unsterilized samples and absent on all sterilized samples, represented a contamination which disappeared after the sterilization process.

Contact angle (CA)

Mean (\pm SD) of the contact angle of each material is summarized in *Table 2*.

UHMPE - The CA was significantly increased by the sterilization method for UHMPE compared to unsterilized UHMPE ($P < 0.001$) without significant difference between sterilization methods (HPGP, EO and ST).

NLL - The CA was significantly increased by the sterilization method for NLL compared to unsterilized NLL. ($P < 0.001$) HPGP-sterilized NLL had a significantly higher CA compared to EO-sterilized NLL ($P < 0.001$) and ST-sterilized NLL ($P < 0.001$). ST-sterilized NLL had a significantly higher CA compared to EO-sterilized NLL ($P = 0.001$).

NFL - The CA was significantly increased by the sterilization method for NFL compared to unsterilized NFL. ($P<0.001$) HPGP-sterilized NFL had a significantly higher CA compared to EO-sterilized NFL ($P<0.001$) and ST-sterilized NFL ($P<0.001$). ST-sterilized NFL had a significantly higher CA compared to EO-sterilized NFL ($P<0.001$).

UHMPE had a significantly higher CA compared to NLL and NFL, unsterilized, HPGP-, EO-, and ST-sterilized ($P<0.001$).

Roughness

Mean (\pm SD) of the roughness of each material is summarized in *Table 3*.

UHMPE - UHMPE seemed to have a higher roughness compared to NLL and NFL. However, only one UHMPE sample was examined because the analysis of UHMPE damaged the point of the AFM (probably due to the physical structure of the UHMPE-fibers). Subsequent analyses of UHMPE samples were not performed to avoid further damage to the AFM.

NLL - The roughness was not significantly affected by the sterilization method for NLL.

NFL - The roughness was not significantly affected by the sterilization method for NFL.

Discussion

The HPGP sterilization method was compared to EO and ST sterilization of nylon and polyethylene sutures used to stabilize cruciate – deficient stifles in dogs. Based on the results of the present study it was demonstrated that sterilization methods affect the physicochemical properties of polymeric implants. Our results indicate that the HPGP sterilization method compared positively to EO or ST sterilization in regards to the chemico-physical properties of nylon and polyethylene lines.

It was demonstrated that sterilization method used for polymers in the medical field should be considered in the design of new products, since it might affect, or be used to enhance, the outcome of the ready-to-implant prostheses (10,35-37). Surface oxydation has previously been reported on HPGP-sterilized polymers which is considered a major trigger for inflammation, foreign body reactions and prosthesis failure(35,38,39). As previously reported, these oxydation reactions possibly occur in three separate stages (35): (1) exposure to the highly reactive H_2O_2 vapor during the chemical phase of sterilization (30-32); (2) exposure to the reactive species of the plasma phase itself (28,29); and (3) following sterilization, when free radicals which are generated during plasma treatment on the polymer surfaces react with oxygen from the atmosphere (28,29,40). With the exception of ST-sterilized NFL, surface oxydation was not observed in our study, which is in contrast to a previous study of HPGP-sterilized UHMPE (36).

In correlation with our results no significant chemical modifications were reported for HPGP- and EO-sterilized poly(L-lactic acid) (41). In another study low oxidation level of UHMPE were found after sterilization with EO, as detected by Fourier transform infrared (FTIR) microscopy but was assumed to be negligible and presumably due to mechanical degradation occurring during sample preparation for FTIR analysis (10).

In contrast to HPGH and EO sterilization, ST sterilization produced a surface degradation of NFL in our study. Based on this finding, EO or HPGP sterilization could have an advantage over ST sterilization of NFL. However, it is also important to acknowledge that the variability in the manufacturing process of fishing line may have a significant impact on the physicochemical properties of the material. Therefore, the use of NFL for surgical procedures has to be critically evaluated.

Sodium and chloride which were found on all unsterilized samples and their absence on all sterilized samples were presumably due to contamination occurring during sample preparation for XPS analysis.

Silica which was present on the surface of UHMPE, NLL and NFL samples was probably incorporated into the matrix during the manufacturing process as an antiblocking agent as previously reported for the UHMPE (42). Unfortunately, the authors were not able to obtain the generic composition of nylon (NLL and NFL) and polyethylene (UHMPE) lines to confirm this assumption. Also without this information it was not possible to interpret the chemical modification on the surface of the samples following the sterilization.

In our study HPGP, EO and ST sterilization increased the hydrophobicity of the surfaces of UHMPE, NLL and NFL, with the EO sterilization having the smallest effect. Successful implantation of a material is thought to be affected by its wettability and its surface energy (43-47). It has been previously reported that HPGP, EO and ST sterilisations can affect surface wettability and energy of polymers (48-55). A previous study also reported an increased CA after HPGP and EO sterilization for UHMPE (36). HPGP sterilization was also reported to produce a more hydrophilic surface for poly(L-lactic acid) and EO sterilization to produce a more hydrophobic surface on poly(L-lactic acid) in the same study (41). As a general rule, as the proportion of polar groups (e.g. O-H groups) increases on the surface of an implant, also do the attractive forces towards highly polar water molecules increase. A greater CA after EO sterilization could be explained by the likely modification of the chain ends by radical reaction of the EO molecule as previously reported for poly(L-lactic acid) (41). Increased wettability after HPGP sterilization was likely the result of the addition of

new polar groups on the poly(L-lactic acid) surface (41). Decreased wettability of HPGP-sterilized polymer in our study could be related to a decrease in functional groups on the polymer surface. However, a recent study reported a more hydrophobic surface of UHMPE after HPGP sterilization without any significant variation in functional groups at the UHMPE surface (36). These findings outline the fact that the sterilization process can induce significant and contrary changes in wettability on medical implants depending on the polymer and the sterilization method used. The CA of UHMPE was also significantly increased to the CA of NLL or NFL in our study, no matter which sterilization method was used. UHMPE is considered to be hydrophobic, with a low surface energy and a low electrostatic charge (56). These findings could be a concern for UHMPE compared to NLL or NFL considering that surface hydrophobicity facilitates the bacterial contact and leads to increased early bacterial adherence (36,57). The modifications of surface wettability, hydrophobicity and surface charges have also been shown to alter the extent of protein adsorption, which is the initial and crucial step in the polymer, cell and bacteria interactions (37,58). However, the influence of the hydrophobicity on bacterial adhesion is controversial and results from previous studies are inconsistent and sometimes contradictory (59-64). Finally, increasing surface hydrophilicity has been shown to improve the biocompatibility of the medical devices at least in vitro (58). Surface modifications have to be hydrophilic to prevent the adsorption of proteins, thus making NLL and NFL more attractive than UHMPE (37).

We report a markedly increased roughness of the surface of UHMPE in comparison to NLL or NFL, without significant differences between NLL and NFL even after sterilization. Although surface roughness influences bacterial attachment and adhesion to metal, this factor was found to be less important among polymers, as

previously mentioned (36,65). It was also suggested a threshold surface roughness for bacterial retention, below which bacterial accumulation could be no further reduced (6,66,67). However, previous studies reported an increase bacterial adhesion and colonization on rougher biomaterials, and mentioned that influence of the surface roughness dominates the influence of surface hydrophobicity (6,64,68-71). Increase in hydrophobicity with roughness was previously reported (36,72). Therefore, a greater surface roughness could potentially explain a greater CA obtained for UHMPE (a multifilament implant) compared to NLL or NFL (monofilament) in this study.

XPS analysis is probably the most widely used technique to analyse the surface of polymers because of its simplicity in use and interpretation of the data. XPS is capable of providing quantitative elemental and chemical bonding information. However, its molecular information and spatial resolution is limited. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) analysis could have been added to the XPS analysis in this study to provide further information regarding spatial resolution and chemical composition of the tested samples. Contact angle measurements are appropriate for screening of the biological performance of implant materials in vitro and in vivo (35,36,37,41). Small variations of contact angles have often been previously reported when CA of polymer surfaces were studied (35,73-75). Modern goniometers digitalise the drop profile along with numerical integration of the Young-Laplace equation to generate the best-fit curve. It is a versatile, repeatable and accurate technique for determining the interfacial tension and contact angle of polymer. For conventional goniometers, as used in our study, determination of the contact angle is dependent upon the subjective placement of two lines: one characterising the edge of the drop and the other characterising the plane of contact between the drop and the solid surface. The reproducibility in the measurement depends upon the criteria used

to place these lines. With computerised goniometers, these criteria are based upon the analysis of the image of the drop and would have decreased the standard deviation obtained in this study. Factors such as illumination intensity, focus, contrast, refractive indices of the materials and the reflectance of the solid surface can also affect measurements. Finally, AFM has several advantages over scanning electron microscope (SEM). AFM provides a three-dimensional profile of the surface and samples viewed by AFM do not require any special treatments that would irreversibly change or damage them. AFM can also provide higher resolution than SEM and produces a smaller scan image compared to the SEM. However, as with any other imaging technique, there is the possibility of image artifacts, which could be induced by an unsuitable tip, a poor operating environment, or even by the sample itself as reported in our study where the UHMPE damaged the tip of the AFM during the experimentation.

Based on the results of the present study, the effects of HPGP sterilization on the physicochemical-properties of nylon and polyethylene lines compared favorably to EO and ST sterilization. HPGP offers an attractive alternative for sterilization of nylon and polyethylene lines used for stabilization of the canine stifle joint. NLL and NFL may be more attractive implants compared to UHMPE regarding wettability and roughness properties. However, before any recommendations are formulated regarding the clinical application of these implants, further studies should evaluate the effects of HPGP, EO or ST sterilization on bacterial and cellular adhesion as well as the influence of body fluids on these polymers.

Acknowledgements

The authors would like to thank the “Fonds en Santé des Animaux de Compagnie (FSAC) de l’Université de Montréal” for their financial supports and Guy Beauchamp for his statistical assistance.

References

1. Arnoczky SP, Marshall JL: The cruciate ligaments of the canine stifle. An anatomical and functional analysis. *Am J Vet Res* 38:1807-1814, 1977
2. Arnoczky SP: The cruciate ligaments: The enigma of the canine stifle. *J Small Anim Pract* 29:71-90, 1988
3. Vasseur PB: Clinical results following nonoperative management for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *Vet Surg* 13:243-246, 1984
4. Caporn TM, Roe SC: Biomechanical evaluation of the suitability of monofilament nylon fishing and leader line for extra-articular stabilization of the canine cruciate ligament deficient stifle. *Vet Comp Orthop Traumatol* 9:126-133, 1996
5. Arciola CR, Alvi FI, An YH, et al.: Implant infection and infection resistant materials: a mini review. *Int J Artif Organs* 28:1119-1125, 2005
6. Tang H, Cao T, Liang X, et al.: Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res* 88A: 454-463, 2009
7. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, et al.: In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant. Interactions with physicochemical surface properties. *Journ of Oral Rehabilitation* 31:140-148, 2004
8. Karakecili AG, Gumusderelioglu M: Comparison of bacterial and tissue cell initial adhesion on hydrophilic/hydrophobic biomaterials. *J Biomater Sci Polym Edn* 13:185-

196, 2002

9. An YH, Friedman RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 43:338-348, 1998
10. Costa L, Luda MP, Trossarelli L, et al.: Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials* 19:659-668, 1998
11. Nair PD: Currently practised sterilization methods—some inadvertent consequences. *J Biomater Appl* 10:121-35, 1995
12. Deng M, Shalaby SW: Effects of γ irradiation, gas environments, and postirradiation aging on ultrahigh molecular weight polyethylene. *J Appl Polymer Sci* 58:2111-9, 1995
13. Hirata N, Matsumoto K-I, Inishita T, et al.: γ -ray irradiation, autoclave and ethylene oxide sterilization to thermosetting polyurethane: sterilization to polyurethane. *Radiat Phys Chem* 46:377-81, 1995
14. Sicard GK, Meinen J, Phillips T, et al.: Comparison of fishing lines for repair of the cruciate deficient stifle. *Vet Comp Orthop Traumatol* 44:138-141, 1999
15. Sicard GK, Hayashi K, Manley PA: Evaluation of 5 types of fishing materials, 2 sterilization methods, and a crimp-clamp system for extra-articular stabilization of the canine stifle joint. *Vet Surg* 31:78-94, 2002
16. Steenland K, Stayner L, Deddens J: Mortality analyses in a cohort of 18 235 ethylene oxide exposed workers: follow up extended from 1987 to 1998. *Occup Environ Med* 61:2-7, 2004
17. Steenland K, Whelan E, Deddens J, et al: Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort study of 7576 women (United States). *Cancer Causes Control* 14:531-539, 2003
18. Steenland K, Stayner L, Greife A, et al: Mortality among workers exposed to ethylene oxide. *N Eng J Med* 324:1402-1407, 1991
19. Their R, Bolt HM: Carcinogenic and genotoxicity of ethylene oxide: New aspects and

recent advances. Crit Rev Toxicol 30:595–608, 2000

20. Stanley P, Bertranou E, Forest F, et al.: Toxicity of ethylene oxide sterilization of polyvinyl chloride in open-heart surgery. J Thorac Cardiovasc Surg 61:309-314, 1971
21. Chien YC, Su PC, Lee LH, et al.: Emission Characteristics of Plastic Syringes Sterilized With Ethylene Oxide—A Controlled Study. Journal Biomed Mater Res B Appl Biomater 91:579-86, 2009
22. Poothulil J, Shimizu A, Day RP, et al.: Anaphylaxis from the product(s) of ethylene oxide gas. Ann Intern Med 82:58-60, 1975
23. Buben I, Melicherčíková V, Novotná N, et al.: Problems associated with sterilization using ethylene oxide: residues in treated materials. Cent Eur J Public Health 4:197-202, 1999
24. Environment Canada: Guidelines for the Reduction of Ethylene Oxide Releases from Sterilization Applications. Part I Canada Gazette, April 3rd 2004
<http://canadagazette.gc.ca/partI/2004/20040403/html/notice-e.html#i2>
25. Slatter D: Textbook of small animal surgery. Philadelphia, W.B Saunders Company, Ed:3rd, 2003, pp160-161
26. Caputo RA: The AbTox Plazlyte sterilization system: A CFC free system. Zentralsterilisation, Int. J. Processing Sterile Supply, an Official Publication of the ESH 4 1994
27. Feldman LA, Hui H: Compatibility of medical devices and materials with low-temperature H₂O₂ gas plasma. Med. Device & Diagn Ind 57-62, 1997
28. Egitto FD, Vukanovic V, Taylor GN: Plasma etching of organic polymers, in: Plasma Deposition, Treatments, and Etching of Polymers, R. D'Agostino, ed., Academic Press, Boston, 1990, pp321-422
29. Liston EM, Martinu L, Wertheimer MR: Plasma surface modification of polymers for

- improved adhesion: a critical review. *J Adhes Sci Technol* 7:1091-1127, 1993
30. Baldry MGC: The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol* 54:417-423, 1983
 31. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Nakamura A: Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide. *Biomaterials* 16:177-83, 1995
 32. Meijis GF, McCarthy SJ, Rizzardo E, et al.: Degradation of medical-grade polyurethane elastomers: the effect of hydrogen peroxide in vitro. *J Biomed Mater Res* 27:345-356, 1993
 33. Gatineau M, Huneault L, Lussier B, et al.: Mechanical evaluation of hydrogen peroxide gas plasma sterilization of nylon lines used for extra-articular stabilization of the canine stifle joint *Vet Surg* 39:48-53, 2010
 34. Widmer AF, Frei R. Decontamination, disinfection, and sterilization. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller MA, Landry ML, eds. *Manual of clinical microbiology*, 9th edn. Washington, DC: ASM Press, 2007, pp65-96
 35. Lerouge S, Tabrizian M, Wertheimer MR, et al.: Safety of plasma-based sterilization: Surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes. *Bio-Med Mat and Engineering* 12:3-13, 2002
 36. Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, et al.: Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin Microbiol Infect* 16:1036-1041, 2010
 37. Calvet JL, Grafahrend D, Klee D, et al.: Sterilization effects on starPEG coated polymer surfaces: characterization and cell viability. *J Mater Sci: Mater Med* 19:1631-1636, 2008
 38. Reno F, Lombardi F, Cannas M: UHMWPE oxidation increases granulocytes activation: a role in tissue response after prosthesis implant. *Biomaterials* 24:2895-2900, 2003

39. Ward RA: Phagocytic cell function as an index of biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant* 9:46-56, 1994
40. Wertheimer, MR, Fozza AC, Hollander A: Industrial processing of polymers by low-pressure plasmas: the role of VUV radiation. *Nuclear Instrum Methods in Phys Res B* 151:65-75, 1999
41. Peniston SJ, Choi SJ: Effect of Sterilization on the Physicochemical Properties of Molded Poly(L-lactic acid). *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 80B:67-77, 2007
42. Van Essche G, Kromminga T, Schmidt A: New highly efficient silica anti-blocking aids for PE and PP films. *J Plastic Film Sheet* 16:155-168, 2000
43. Baier RE, Shafrin EG, Zisman WA: Adhesion: Mechanisms that assist or impede it. *Science*, 162:1360-1368, 1968
44. Baier RE, Meyer AE, Natiella JR: Surface properties determine bio-adhesive outcomes: Methods and results. *J Biomed Mater Res*, 18:337-355, 1984
45. Doundoulakis JH: Surface analysis of titanium after sterilization: Role in implant-tissue interface and bioadhesion. *J Prosthet Dent* 58:471-478, 1987
46. Uyen HM, van Dijk LJ, Busscher HJ: Adhesion of stainable, calcium-rich deposits on substrata with different surface- free energies. An in vivo study in beagle dogs. *J Clin Periodontol* 16:393-397, 1989
47. Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CML, et al.: The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. *J Periodontol* 65:162-167, 1994
48. Scotchford CA, Gilmore CP, Cooper E, et al.: Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res* 59:84-99, 2002

49. Lucas AD, Merritt K, Hitchins VM, et al.: Residual ethylene oxide in medical devices and device material. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 66:548-552, 2003
50. Centola DT, Ayoub KI, Lao NT, et al.: Variables affecting simulated use determination of residual ethylene oxide in medical devices. *J AOAC Int* 84:512-518, 2001
51. Baier RE, Meyer AE, Akers CK, et al.: Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. *Biomaterials* 3:241-245, 1982
52. Wang JH, Claesson PM, Parker JL, et al.: Dynamic contact angles and contact angle hysteresis of plasma polymers. *Langmuir* 10:3887-3896, 1999
53. Lee VA, Craig RG, Filisko FE, et al.: Preparation and characterization of high-surface area polymer substrates for microcalorimetry. *J Biomed Mater Res* 31:51-62, 1996
54. Lander LM, Siewierski LM, Brittain WJ, et al.: A systematic comparison of contact angle methods. *Langmuir* 9:2237-2239, 1993
55. Higashi JM, Wang IW, Shlaes DM, et al.: Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater Res* 39:341-350, 1998
56. An YH, Friedman RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 43:338-348, 1998
57. Fletcher M, Loeb GI: Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surface. *Appl Environ Microbiol* 37:67-72, 1979
58. Thevenot P, Hu W, Tang L: Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8:270-280, 2008
59. MacKintosh EE, Patel JD, Marchant RE, et al.: Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *J Biomed Mater Res A* 78:836-842, 2006
60. Price C, Waters MGJ, Williams DW, et al.: Surface modification of an experimental

- silicone rubber aimed at reducing initial candidal adhesion. *J Biomed Mater Res* 63:122-128, 2002
61. Nassar U, Meyer AE, Ogle RE, et al.: The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. *Periodontology* 2000 8:114-124, 1995
 62. Quirynen M, Bollen CML, Papaioannou W, et al.: The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11:169, 1996
 63. Morgan TD, Wilson M: The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol* 91:47, 2001
 64. Quirynen M, Vandermei HC, Bollen CML, et al.: An in-vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supragingival and subgingival plaque. *J Dent Res* 72:1304-1309, 1993
 65. Jansen B, Kohnen W: Prevention of biofilm formation by polymer modification. *J Ind Microbiol* 15:391-396, 1995
 66. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M: Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater* 13:258-269, 1997
 67. An YH, Friedman RJ, Draughn RA, et al.: Rapid quantification of *Staphylococci* adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. *J Microbiol Methods* 24:29-40, 1995
 68. Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Bruque JM, et al.: The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 249:99-103, 2004
 69. Mcallister EW, Carey LC, Brady PG, et al.: The role of polymeric surface smoothness

of biliary stents in bacterial adherence, biofilm deposition, and stent occlusion. *Gastrointest Endosc* 39:422-425, 1993

70. Tebbs SE, Sawyer A, Elliott TSJ: Influence of surface-morphology on in-vitro bacterial adherence to central venous catheters. *Br J Anaesth* 72:587-591, 1994
71. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, et al.: The influence of surface freeenergy and surface-roughness on early plaque-formation — An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17:138-144, 1990
72. Wenzel RN. Surface roughness and contact angle. *J Phys Colloid Chem* 53:1466-1467, 1949
73. Wang JH, Claesson PM, Parker JL, et al.: Dynamic contact angles and contact angle hysteresis of plasma polymers. *Langmuir* 10:3887-3896, 1994
74. Lee VA, Craig RG, Filisko FE , et al.: Preparation and characterization of high-surface area polymer substrates for microcalorimetry. *J Biomed Mater Res* 31:51-62, 1994
75. Lander LM, Siewierski LM, Brittain WJ, et al.: A systematic comparison of contact angle methods. *Langmuir* 9:2237-2239, 1993

Table 1-Chemical surface composition (%) determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines.

| UHMPE | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|--------------|---------------------|-------------|-----------|-----------|
| C1s | 68.30 | 59.88 | 63.98 | 65.70 |
| O1s | 20.44 | 25.92 | 23.78 | 21.50 |
| N1s | / | 0.87 | / | 1.24 |
| Si2p | 11.26 | 13.33 | 12.24 | 11.56 |
| Na1s | / | / | / | / |
| Cl2p | / | / | / | / |

| NLL | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|-------------|---------------------|-------------|-----------|-----------|
| C1s | 76.67 | 76.65 | 75.61 | 76.53 |
| O1s | 15.76 | 18.70 | 18.16 | 14.41 |
| N1s | 2.98 | 1.08 | 3.14 | 6.73 |
| Si2p | 3.62 | 3.57 | 3.09 | 2.33 |
| Na1s | 0.62 | / | / | / |
| Cl2p | 0.35 | / | / | / |

| NFL | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|-------------|---------------------|-------------|-----------|-----------|
| C1s | 74.46 | 73.41 | 78.69 | 84.32 |
| O1s | 17.55 | 18.89 | 15.01 | 9.25 |
| N1s | 4.04 | 5.89 | 3.82 | 4.92 |
| Si2p | 3.00 | 1.81 | 2.48 | 1.51 |
| Na1s | 0.23 | / | / | / |
| Cl2p | 0.72 | / | / | / |

HPGP: Hydrogen peroxide gas plasma, EO: Ethylene oxide, ST: Steam

UHMPE : Ultra High Molecular Weight Polyethylene, NLL: Nylon leader line, NFL:

Nylon fishing line

C1s: Carbon, O1s: Oxygen, N1s: Nitrogen, Si2s: Silica, Na1s: Sodium, Cl2s: Chloride

Table 2-Contact angle (mean±SD) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines.

| | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|--------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UHMPE | 94.78±1.78 ^c | 119.80±0.85 _a | 119.80±0.74 _a | 117.20±3.72 _a |
| NLL | 56.08±1.32 ^f | 108.80±2.77 _b | 85.50±0.77 _e | 90.84±0.70 _d |
| NFL | 50.24±0.68 ^g | 109.72±0.46 _b | 57.64±2.35 ^f | 98.36±1.15 _c |

HPGP: Hydrogen peroxide gas plasma, EO: Ethylene oxide, ST: Steam

UHMPE : Ultra High Molecular Weight Polyethylene, NLL: Nylon leader line, NFL:

Nylon fishing line

^{a,b} Values that share a superscript are not statistically different

Table 3-Roughness (mean±SD) of unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines.

| | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UHMPE | 235* | / | / | / |
| NLL | 66.82±11.56 _a | 64.24±18.94 _a | 69.44±11.72 _a | 63.52±27.86 _a |
| NFL | 67.08±15.86 _a | 66.10±14.40 _a | 62.38±18.93 _a | 64.44±14.27 _a |

HPGP: Hydrogen peroxide gas plasma, EO: Ethylene oxide, ST: Steam

UHMPE : Ultra High Molecular Weight Polyethylene, NLL: Nylon leader line, NFL:

Nylon fishing line

^{a,b} Values that share a superscript are not statistically different

* Only one sample was examined for this group

**Bioadhesive evaluation of hydrogen peroxyde gas plasma
sterilization of nylon and polyethylene lines used for
stabilization of the canine stifle joint**

Matthieu GATINEAU⁽¹⁾, DMV, IPSAV, **Alexander O. EL-WARRAK⁽¹⁾**, DMV,
MSc, PhD, **Christian BOLLIGER⁽¹⁾**, Dr.med.vet. DACVS, DECVS, **Michael
MOUREZ⁽¹⁾**, PhD, **Frederic BERTHIAUME⁽¹⁾**, MSc, **Marie ARCHAMBAULT⁽¹⁾**,
MSc, PhD, DACVM

(1) Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada

Article soumis au journal *American Journal of Veterinary Research*

SHORT ABSTRACT

Objective— To compare the effects of hydrogen peroxide gas plasma (HPGP), ethylene oxide (EO) and steam (ST) sterilizations on the bioadhesive properties of nylon and polyethylene lines used for stabilization of the canine stifle joint.

Study Design—In vitro study.

Samples—Non-sterilized, HPGP-, EO- and ST- sterilized samples of 36.3-kg test nylon leader line (NLL), of 57.8-kg test nylon fishing line (NFL), and of 2-mm Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMPE) were used.

Methods—Bacterial adherence on non-sterilized NLL, NFL and UHMPE as well as on HPGP-, EO- and ST-sterilized samples was tested with *Staphylococcus intermedius* and *Escherichia Coli*. Five samples were examined for each group and final colony counts were obtained.

Results—Bacterial adherence was significantly affected by the method of sterilization for NLL, NFL and UHMPE. For most of the samples, HPGP sterilization had a similar or lower bacterial adherence compared to EO and ST sterilization respectively. UHMPE had significantly higher bacterial adherence compared to NLL and NFL, no matter which sterilization method was used. ($P<0.001$) NFL had a significantly higher bacterial adherence compared to NLL, after EO sterilization for *S. intermedius*. ($P=0.021$), and after HPGP and EO sterilization for *E.coli*. ($P<0.001$)

Conclusion—The effects of HPGP on the bioadhesive properties of nylon and polyethylene lines compared positively to EO and ST, making HPGP an attractive alternative. NLL and NFL may be a more suitable material compared to UHMPE for

suture prostheses regarding bacterial adherence properties. However, it is difficult to judge the clinical relevance of this assumption.

Introduction

Bacterial contamination of biomaterial surfaces during surgery is the primary cause of implant-related infections (1). Results of previous studies clearly demonstrated that sterilization can affect surface properties of polymers and consequently their adhesive properties (2-5). Rupture of the cranial cruciate ligament is one of the most commonly diagnosed canine orthopedic conditions leading to patient morbidity, reduced activity, and progressive degenerative joint disease (6,7). Surgical stabilization of the stifle is recommended, especially in large breed dogs (8). Surgical techniques such as extra-articular stabilization using a lateral suture (LS) are a well-accepted and commonly performed technique (9). However, according to the author's knowledge, no studies have been published that evaluate the effect of different sterilization methods on bioadhesive properties of LS materials frequently used in veterinary surgery. (10-17)

Compared with steam (ST) sterilization, ethylene oxide (EO) was found to have the least detrimental effects on LS material mechanical characteristics (9,18,19). However, some human and animal studies suggest that ethylene oxide could be carcinogenic and associated with breast and other cancers in those exposed (20-22). Recently the use of EO sterilization in North America has diminished due to strict regulations (23). Hydrogen peroxide gas plasma sterilization (HPGP) is an attractive alternative to the low temperature sterilization with ethylene oxide. Hydrogen peroxide gas plasma sterilization works by synergism between hydrogen peroxide and low temperature gas plasma. Toxic residues or emissions have not been reported; thus aeration, ventilation, and other special procedures are not required (24). System by-products are oxygen and water vapor, and with easy-to-insert cassettes operators never

come in contact with hazardous materials. A recent study reported that HPGP sterilization was an attractive alternative to EO sterilization regarding mechanical properties of nylon lines used for LS (25).

The main objective of this study was to compare the effect of HPGP, EO and ST sterilization methods on the bacterial adherence properties of currently used implants for extra-articular stabilization of cranial cruciate ligament deficient canine stifle joint. We hypothesized that hydrogen peroxide gas plasma sterilization would perform as well as ethylene oxide or steam sterilization and that bacterial adherence of polyethylene line was increased in comparison to nylon lines.

Material and Methods

Samples were selected from nylon leader line (NLL), nylon fishing line (NFL) and Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMPE) due to their wide application in small animal orthopedic procedures. Samples of 36.3-kg [80lb] test monofilament nylon leader line (NLL) (Mason Hard Type Leader Material, Mason Tackle Company, Otisville, MI, USA) and of 57.8-kg [127.4lb] test monofilament nylon fishing line (NFL) (Tortue La Soie-Neyme SA, Boulogne, France) and 2-mm Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMPE) (Fibertape 2mm, Arthrex SAS, Lezennes, France) were examined. HPGP sterilization was performed as recommended by the manufacturer for 28 minutes using a Sterrad[®] system. (ASP J&J Company Medical Products, Irvine, CA, USA) EO sterilization was performed as recommended by the manufacturer at 55°C and 56kPa using a 3M Steri-Vac[®] system. (3M Company, St Paul, MN, USA) and ST sterilization was performed as recommended by the manufacturer at - 121°C and 1.1bar using a Kwiklave[™] autoclave. After EO sterilization, a 12-24h aeration time was performed as recommended to remove any traces of this toxic chemical (26). Samples

were cut in 10 mm length. Thus twelve groups were successively tested: unsterilized, HPGP-, EO- and ST-sterilized NLL samples; unsterilized, HPGP-, EO- and ST-sterilized NFL samples; and unsterilized, HPGP-, EO- and ST-sterilized UHMPE samples.

Gram positive and Gram negative bacteria were used to evaluate bacterial adherence on samples. As Gram positive bacteria, a well-characterized biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC accession number 35984) was tested and as a negative control, a non biofilm-producing *S. epidermidis* (ATCC accession number 12228) was used. As Gram negative bacteria, the *E. coli* K12 strains C600 (obtained from New England Biolabs, genotype: F₋, *thr1*, *leuB6*, *thi1*, *lacY1*, *supE44*, *rfaD1*, *fhuA21*) containing the pAgH vector (this plasmid has been described before and allows expression, under a IPTG-inducible promoter, of the AIDA-I autotransporter and its associated glycosyltransferase, Aah or containing the empty vector pTRC99a (Pharmacia Biotech) were tested (27).

Staphylococcus epidermidis and *E. coli* biofilms tests

S. epidermidis strains were inoculated into a Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco) containing 0.25% glucose with a turbidity of 0.5 McFarland. 1 mL of the *S. epidermidis* suspension was inoculated in a 24 wells plates containing different sutures (1 cm length each) and incubated overnight at 37°C. The *E. coli* biofilm formation was monitored as previously described (27). Briefly, 1 mL of normalized cultures of *E. coli* C600 harboring empty vector pTRC99a or pAgH were grown without agitation for 24 h at 30°C in M9 medium containing 0.005% proline, leucine, and threonine and 100 µgml⁻¹ ampicillin in a 24 wells plate containing the different sutures. Five sutures samples of UHMPE, NLL and NFL were assessed for each group (unsterilized, HPGP-,EO-,ST-sterilized). At the end of the incubation period, the individual samples were taken out of

the media and successively washed 3 times with 1 mL phosphate-buffered saline (PBS) to remove non-adherent microorganisms.

The adhered *S. epidermidis* or *E. coli* biofilms were separated from the surface of the sutures by adding 1 ml of PBS (for *S. epidermidis*) or PBS containing 0.5 M NaCl and 1% triton X-100 (for *E. coli*) and vortexed for 10 minutes at room temperature. The bacteria were diluted in PBS and 100 μ L of each dilution bacterial suspension was plated on LB agar (for *S. epidermidis*) or LB agar containing 100 μ g \cdot ml⁻¹ ampicillin (for *E. coli*). After 24-hour, the number of colony-forming units (CFUs) were counted accounting for the dilution factor.

A two-way analysis of variance, with materials (NLL, NFL and UHMPE) and groups (control, HPGP, EO and ST) as main factors, and interaction between materials and groups, was used to examine the effect of sterilization methods on bacterial adherence for each material type, and the effect of each material type on bacterial adherence for each sterilization method. A post-hoc Tukey test was used to test differences between pairs of means. Version 9.1 of SAS (Cary, N.C.) was used for statistical analyses and a level of significance of 0.05 was used throughout the study.

Results

Number of CFUs of S. epidermidis

Mean \pm SD in log of the CFUs of each material are summarized in *Table 1*.

UHMPE - The CFU was significantly increased after HPGP, EO and ST sterilisation for UHMPE compared to unsterilized UHMPE ($P < 0.001$) without significant difference between sterilization methods (HPGP, EO and ST).

NLL – There was no significant difference between unsterilized NLL and HPGP-sterilized NLL. The CFU for NLL was significantly decreased after EO sterilisation and

increased after ST sterilization compared to unsterilized NLL (respectively $P < 0.001$ and $P = 0.009$). ST-sterilized NLL had a significantly higher CFU compared to HP GP-sterilized NLL ($P = 0.008$) which had a significantly higher CFU compared to EO-sterilized NLL ($P < 0.001$).

NFL – There was no significant difference between unsterilized NFL, HP GP- and EO-sterilized NFL. The CFU for NFL was significantly increased after ST sterilisation compared to unsterilized NFL ($P < 0.001$). ST-sterilized NFL had a significantly higher CFU compared to HP GP-sterilized NFL ($P < 0.001$) and EO-sterilized NFL ($P < 0.001$) without significant difference between HP GP-sterilized NFL and EO-sterilized NFL.

UHMPE had a significantly higher CFU compared to NLL and NFL, unsterilized, HP GP-, EO-, and ST-sterilized ($P < 0.001$).

NFL had a significantly higher CFU compared to NLL after EO sterilization. ($P = 0.021$) There was no significant difference between NFL and NLL, unsterilized, and after HP GP or ST sterilization.

Number of CFUs of E. coli

Mean \pm SD in log of the CFUs of each material are summarized in *Table 2*.

UHMPE - There was no significant difference between unsterilized UHMPE-, HP GP- and EO-sterilized UHMPE. ST-sterilized UHMPE had a significantly higher CFU compared to HP GP-sterilized and unsterilized UHMPE (respectively $P < 0.001$ and $P = 0.004$) There was no significant difference between ST- and EO-sterilized UHMPE.

NLL – There was no significant difference between unsterilized NLL and ST-sterilized NLL. The CFU for NLL was significantly decreased after HP GP and EO sterilisation compared to unsterilized NLL. (respectively $P = 0.002$ and $P < 0.001$) ST-

sterilized NLL had a significantly higher CFU compared to HPGP-sterilized and EO-sterilized NLL ($P<0.001$) There was no significant difference between HPGP- and EO-sterilized NLL.

NFL – The CFU for NFL was significantly increased after HPGP, EO and ST sterilisation compared to unsterilized NFL ($P<0.001$) without significant differences between HPGP-, EO-and ST-sterilized NFL.

UHMPE had a significantly higher CFU compared to NLL and NFL, unsterilized, HPGP-, EO-, and ST-sterilized. ($P<0.001$)

Unsterilized-NLL had a significantly higher CFU compared to unsterilized-NFL. ($P=0.001$) NFL had a significantly higher CFU compared to NLL, after HPGP and EO sterilization. ($P<0.001$) There was no significant difference between NFL and NLL after ST sterilization.

Discussion

Results in the present study indicate that regarding the bacterial adherence properties of *S. epidermidis* and *E. coli* on nylon and polyethylene lines, HPGP sterilization method compared positively to EO or ST sterilization. Furthermore, UHMPE demonstrated an increased bacterial adherence compared to NLL and NFL in this study. Sterilization methods used for polymers in the medical field should be considered in the design of new products, since it might adversely affect or enhance, the properties of surgical implants (5,10,28,29). The HPGP sterilization method was compared against EO and ST sterilization of nylon and polyethylene lines used to stabilise the canine stifle joint.

A previous study reported that EO sterilization was generally more efficient than HPGP sterilization in preventing bacterial adherence to UHMPE (10). Effects of HPGP

on the bacterial adhesive properties of UHMPE, NLL and NFL compared positively to EO in our study (with the exception of *E. coli* adhesion, which was superior for HPGP sterilization compared to EO sterilization), making HPGP an effective alternative for these implants. Moreover, in our study, bacterial adherence increased after ST sterilization for almost all UHMPE, NLL and NFL samples tested with *S. epidermidis* and *E. coli*. Based on these findings, ST sterilization could represent a less suitable sterilization method compared to HPGP or EO sterilization for polyethylene and nylon lines. It has been well-demonstrated that the presence of suture material in the host tissue increases the susceptibility to infection (11). Bacterial adherence to biomaterial surfaces is an important step in the pathogenesis of prosthetic related infection (12-14). Numerous studies have examined bacterial adhesion and colonization on a variety of biomaterials. In general, factors such as type of organism, its concentration and growth phase as well as the surface properties of the material and bacteria will affect to varying degrees the level of colonization and the formation of biofilm (15-17,30-34). Surface sterilization methods may influence bacterial adherence as demonstrated in this study, and EO and HPGP sterilization alter the surface and biomechanical properties on polymers, at least temporarily (10,25,35).

UHMPE showed an increased adhesion of bacterias when compared to NLL and NFL in our study. Other parameters which considerably influence bacterial adhesion include the roughness of the surface of the substrate (11,14,36,37). In a previous study the roughness and hydrophobicity of the surface of UHMPE was increased in comparison to NLL and NFL, no matter which sterilization method was used (HPGP, EO or ST) (25). The rougher surface provides a wider area for bacterial adherence, multiplication, and biofilm formation (13).

Bacteria adhering to irregular surfaces are better protected against mechanical forces even during the initial phase of reversible adherence. It has been shown that on biomaterials with a rougher surface the bacterial adhesion as well as the colonization is increased (10,13,38-42). UHMPE is also considered to be hydrophobic which facilitates the bacterial contact and leads to increased early adherence (43-45). These findings could potentially explain the differences found in bacterial adhesion properties between polyethylene and nylon lines in our study. Moreover, we found that NFL showed an increased bacterial adhesion compared to NLL after EO sterilization for *S. intermedius*, and after HPGP and EO sterilisation for *E. coli*. These findings suggest that if EO sterilisation is chosen, NLL may be a more suitable material compared to NFL regarding bacterial adherence properties. However, *in vivo* factors of both the bacteria and the biomaterial also influence initial bacterial adhesion, i.e. the presence of adhesive molecules, dissolved proteins and type of host tissue (46). We examined *in vitro* some specific bacterial strains which may simplify the pathogenesis of implant related infection in a clinical setting.

In our study, a gram-positive and a gram-negative bacterium were used. Even if it was not specifically examined, *S. epidermidis* tends to adhere more to nylon and polyethylene lines than *E. coli*. It is reported that differences in the wall of bacterias may result in variable affinities to a surface and should be considered when the bioadhesive properties of a polymer is studied (11,13). The cell wall of a gram-positive bacterium such as *S. intermedius*, consists of a single layer of peptidoglycans. The cell wall of a gram-negative bacterium such as *E. coli*, is a multilayered, complex structure and consists of additional layers of lipopolysaccharides and proteins. In another study bacterias which were more hydrophobic, showed an increased adherence to the test material (14). Factors which may influence *in vitro* early bacterial adhesion to polymer

surfaces include the type of culture medium, culture conditions, incubation time, and the growth phase of the bacterias (33,47,48). In the present study, all strains were identically prepared in order to eliminate the effect of different growth conditions. Even if many methods for bacterial counting have been published, indirect counting methods such as CFU plate counting is widely used and is one of the most popular methods (10,12-14,15-17,39,42,47,49,50). This technique is sensitive and has the advantage of only counting living bacteria. However, several disadvantages of this technique have to be considered: only living bacteria develop colonies that are counted; clumps or chains of bacteria which develop into a single colony cause a gross underestimation of the true bacterial population; and finally colonies develop only from those organisms for which the cultural conditions are suitable for growth. In addition, experimental manipulations take time and could potentially increase the risk of errors especially during dilution and plating steps.

Based on our results, the effects of HPGP sterilization on the bacterial adhesive properties of nylon and polyethylene lines compared positively to EO or ST sterilization, making HPGP an attractive alternative. Bacterial adhesion of *S. intermedius* and *E. Coli* was more extensive on UHMPE compared to NLL and NFL. Therefore, UHMPE may be a less suitable material compared to NLL and NFL for suture prostheses regarding bacterial adherence properties. However, further studies are needed to prove the clinical relevance of our findings.

Acknowledgements

The authors would like to thank the “Fonds en Santé des Animaux de Compagnie (FSAC) de l’Université de Montréal” for their financial supports and Guy Beauchamp for his statistical assistance.

References

- 1.Arciola CR, Alvi FI, An YH, et al.: Implant infection and infection resistant materials: a mini review. *Int J Artif Organs* 28:1119-1125, 2005
- 2.Nair PD: Currently practised sterilization methods–some inadvertent consequences. *J Biomater Appl* 10:121-135, 1995
- 3.Deng M, Shalaby SW: Effects of c irradiation, gas environments, and postirradiation aging on ultrahigh molecular weight polyethylene. *J Appl Polymer Sci* 58:2111-2119, 1995
- 4.Hirata N, Matsumoto K-I, Inishita T, et al.: c-ray irradiation, autoclave and ethylene oxide sterilization to thermosetting polyurethane: sterilization to polyurethane. *Radiat Phys Chem* 46:377-381, 1995
- 5.Costa L, Luda MP, Trossarelli L, et al.: Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials* 19:659-668, 1998
- 6.Arnoczky SP, Marshall JL: The cruciate ligaments of the canine stifle. An anatomical and functional analysis. *Am J Vet Res* 38:1807-1814, 1977
- 7.Arnoczky SP: The cruciate ligaments: The enigma of the canine stifle. *J Small Anim Pract* 29:71-90, 1988
- 8.Vasseur PB: Clinical results following nonoperative management for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *Vet Surg* 13:243-246, 1984
- 9.Caporn TM, Roe SC: Biomechanical evaluation of the suitability of monofilament nylon fishing and leader line for extra-articular stabilization of the canine cruciate ligament deficient stifle. *Vet Comp Orthop Traumatol* 9:126-133, 1996

10. Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, et al.: Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin Microbiol Infect* 16:1036-1041, 2010
11. Chu CC, Williams DF: Effects of physical configuration and chemical structure of suture materials on bacterial adhesion. *The Amer Journ of Surg* 147:197-204, 1984
12. An HY, Friedman RJ, Draughn RA, et al.: Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. *J of Microbiol Methods* 24:29-40, 1995
13. Ha KY, Chung YG, Ryoo SJ: Adherence and biofilm formation of *Staphylococcus Epidermidis* and *Mycobacterium Tuberculosis* on various spinal implants. *Spine* 30:38-43, 2005
14. Verheyen CCPM, Dhert WJA, Blicek-Hogervorst JMA et al.: Adherence to a metal, polymer and composite by *staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis*. *Biomaterials* 14:383-391, 1993
15. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, et al.: In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant. Interactions with physicochemical surface properties. *Journ of Oral Rehabilitation* 31:140-148, 2004
16. O'kte E, Sultan N, Dogan B, et al.: Bacterial adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. *J Periodontol*. 70:1376-1382, 1999
17. Zhao Q, Liu Y, Wang C, et al.: Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. *Med Eng and physics* 30:341-349, 2008
18. Sicard GK, Meinen J, Phillips T, et al.: Comparison of fishing lines for repair of the cruciate deficient stifle. *Vet Comp Orthop Traumatol* 44:138-141, 1999

19. Sicard GK, Hayashi K, Manley PA: Evaluation of 5 types of fishing materials, 2 sterilization methods, and a crimp-clamp system for extra-articular stabilization of the canine stifle joint. *Vet Surg* 31:78-94, 2002
20. Steenland K, Stayner L, Deddens J: Mortality analyses in a cohort of 18 235 ethylene oxide exposed workers: follow up extended from 1987 to 1998. *Occup Environ Med* 61(1):2-7, 2004
21. Steenland K, Whelan E, Deddens J, et al: Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort study of 7576 women (United States). *Cancer Causes Control* 14(6):531-539, 2003
22. Steenland K, Stayner L, Greife A, et al: Mortality among workers exposed to ethylene oxide. *N Eng J Med* 324(20):1402-1407, 1991
23. Environment Canada: Guidelines for the Reduction of Ethylene Oxide Releases from Sterilization Applications. Part I Canada Gazette, April 3rd 2004
<http://canadagazette.gc.ca/partI/2004/20040403/html/notice-e.html#i2>
24. Slatter D. Textbook of small animal surgery. Philadelphia, W.B Saunders Company, Ed:3rd, 2003, pp160-161
25. Gatineau M, Huneault L, Lussier B, et al.: Mechanical evaluation of hydrogen peroxyde gas plasma sterilization of nylon lines used for extra-articular stabilization of the canine stifle joint. *Vet Surg* 39:48-53, 2010
26. Widmer AF, Frei R. Decontamination, disinfection, and sterilization. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller MA, Landry ML, eds. *Manual of clinical microbiology*, 9th edn. Washington, DC: ASM Press, 2007; pp65–96
27. Charbonneau ME, Berthiaume F, Mourez M: Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) *J Bacteriol* 188(24):8504-8512, 2006

28. Lerouge S, Tabrizian M, Wertheimer MR, et al.: Safety of plasma-based sterilization: Surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes. *Bio-Med Mat and Engineering* 12:3-13, 2002
29. Calvet JL, Grafahrend D, Klee D, et al.: Sterilization effects on starPEG coated polymer surfaces: characterization and cell viability. *J Mater Sci: Mater Med* 19:1631-1636, 2008
30. Mcallister EW, Carey LC, Brady PG, et al.: The role of polymeric surface smoothness of biliary stents in bacterial adherence, biofilm deposition, and stent occlusion. *Gastrointest Endosc* 39:422-425, 1993
31. Wendel RN: Surface roughness and contact angle. *J Phys Colloid Chem* 53:1466-1467, 1949
32. Bayoudh S, Othmane A, Bettaieb F, et al.: Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Mater Sci Eng C Biomimetic Supramol Syst* 26:300-305, 2006
33. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and method for study. *FEMS Microbiol Rev* 23:179, 1999
34. Roosjen A, Norde W, van der Mei HC, et al.: Characterization of polymer surfaces and thin films. *Prog Colloid Polym Sci* 132:138-144, 2006
35. Rhodes NP, Wilson DJ, Williams RL: The effect of gas plasma modification on platelet and contact phase activation processes. *Biomaterials* 28: 4561-4570, 2007
36. Quirynen M, Bollen CML: The influence of surface-roughness and surface-free energy on supragingival and subgingival plaque-formation in man—A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22:1-14, 1995
37. Katz S, Izhar M, Mirelman D: Bacterial adherence to surgical sutures. A possible factor in suture induced infection, *Ann. Surg.* 184, 35-41, 1981

38. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD: Influence of metal implants on infection. *J Bone Joint Surg Br* 76:717-720, 1994
39. Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, et al.: Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol* 21:207-213, 1995
40. Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Bruque JM, et al.: The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 249:99-103, 2004
41. Quirynen M, Vandermei HC, Bollen CML, et al.: An in-vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supragingival and subgingival plaque. *J Dent Res* 72:1304-1309, 1993
42. Tebbs SE, Sawyer A, Elliott TSJ: Influence of surface-morphology on in-vitro bacterial adherence to central venous catheters. *Br J Anaesth* 72:587-591, 1994
43. Wertheimer MR, Fozza AC, Hollander A: Industrial processing of polymers by low-pressure plasmas: the role of VUV radiation, *Nuclear Instrum. Methods in Phys Res B* 151:65-75, 1999
44. MacDonald DE, Deo N, Markovic B, et al.: Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 23:1269-1279, 2002
45. Hess H, Vogel V: Molecular shuttles based on motor proteins: active transport in synthetic environments. *J Biotech* 82:67-85, 2001
46. Karakecili AG, Gumusderelioglu M: Comparison of bacterial and tissue cell initial adhesion on hydrophilic/hydrophobic biomaterials. *J Biomater Sci Polym Edn* 13:185-196, 2002
47. Hogt AH, Dankert J, Feijen J: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to methacrylate polymers and copolymers. *J Biomed Mater Res* 20:533-545, 1986

48. Roosjen A, Norde W, Mei HCvd, et al.: The Use of Positively Charged or Low Surface Free Energy Coatings versus Polymer Brushes in Controlling Biofilm Formation. *Progr Colloid Polym Sci* 132:138-144, 2006
49. Li BK, Logan BE: Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 36:81-90, 2004
50. Grivet M, Morrier JJ, Benay G, et al.: Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med* 11:637-642, 2000

Table 1-Number of CFUs of *Staphylococcus intermedius* (mean±SD in log) on unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines.

| | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|--------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| UHMPE | 5.77±0.09 ^b | 6.63±0.09 ^a | 6.63±0.07 ^a | 6.78±0.08 ^a |
| NLL | 5.27±0.21 ^c | 5.27±0.16 ^c | 4.75±0.18 ^d | 5.64±0.07 ^b |
| NFL | 4.98±0.08 ^{c,d} | 5.07±0.18 ^c | 5.10±0.19 ^c | 5.73±0.15 ^b |

HPGP: Hydrogen peroxide gas plasma, EO: Ethylene oxide, ST: Steam

UHMPE : Ultra High Molecular Weight Polyethylene, NLL: Nylon leader line, NFL:

Nylon fishing line

^{a,b} Values that share a superscript are not statistically different

Table 2-Number of CFUs of *Escherichia coli* (mean ±SD in log) on unsterilized, hydrogen peroxide gas plasma, ethylene oxide and steam sterilized samples of nylon and polyethylene lines.

| | Unsterilized | HPGP | EO | ST |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| UHMPE | 5.27±0.05 ^{b,c} | 5.13±0.09 ^c | 5.47±0.04 ^{a,b} | 5.56±0.04 ^a |
| NLL | 4.50±0.14 ^e | 4.20±0.09 ^f | 4.08±0.11 ^f | 4.74±0.09 ^{d,e} |
| NFL | 4.18±0.14 ^f | 4.63±0.17 ^{d,e} | 4.75±0.12 ^d | 4.75±0.08 ^d |

HPGP: Hydrogen peroxide gas plasma, EO: Ethylene oxide, ST: Steam

UHMPE : Ultra High Molecular Weight Polyethylene, NLL: Nylon leader line, NFL:

Nylon fishing line

^{a,b} Values that share a superscript are not statistically different

DISCUSSION-CONCLUSION

Analyse de la composition chimique de surface par spectroscopie photo-électronique à rayons X (XPS)

Ce projet a démontré que la stérilisation d'implants synthétiques utilisées lors de stabilisation extra-articulaire par suture latérale (SL) (fil de nylon ou de polyéthylène) pouvait entraîner une oxydation de la surface des ces implants et notamment la stérilisation à la vapeur sur le fil de nylon pêche. Considérant que la stérilisation au HPGP ou à l'EO ne semblait pas affecter ou oxyder la surface du fil de nylon pêche, il semble prudent de recommander ces deux dernières méthodes de stérilisation si le fil de nylon pêche étudié dans cette étude est utilisé. Pour les deux autres types de fil étudiés dans ce projet : le fil de nylon leader et le fil de polyéthylène, la stérilisation au HPGP semble une alternative intéressante à la stérilisation à l'EO et à la vapeur considérant l'absence d'oxydation de surface de ces implants avec ces procédés de stérilisation.

Évaluation de la mouillabilité de surface par goniométrie

La stérilisation augmentait significativement l'angle de contact donc l'hydrophobicité de tous les types de fil étudiés, quelque soit la méthode de stérilisation utilisée. La stérilisation à l'EO affectait le moins les propriétés de mouillabilité de surface des implants étudiés dans ce projet donc ce procédé de stérilisation pourrait être favorisé au profit de la stérilisation au HPGP ou à la vapeur si l'on considère uniquement le critère de mouillabilité. L'hydrophobicité du fil de polyéthylène était également significativement plus élevé que ceux du fil de nylon pêche et du fil de nylon leader peu importe la méthode de stérilisation utilisée. Ce résultat est très intéressant considérant qu'une surface hydrophobe peut faciliter l'adhésion bactérienne et qu'une surface davantage hydrophile prévient l'adsorption de protéines et améliore la biocompatibilité d'un implant. Selon le critère de mouillabilité de surface de ces

implants, le fil de nylon pêche ou de nylon leader pourrait être donc plus attrayant que le fil de polyéthylène étudié dans ce projet.

Évaluation de la rugosité de surface par microscopie à force atomique

La méthode de stérilisation n'affectait pas significativement la rugosité pour le fil de nylon pêche et le fil de nylon leader. L'analyse par l'AFM ne nous a cependant pas permis d'évaluer l'effet de la méthode de stérilisation sur la rugosité du fil de polyéthylène du fait de sa constitution propre (fil tressé qui a endommagé la pointe de l'AFM). Toutefois, la valeur obtenue pour le groupe de fil de polyéthylène non stérilisé était beaucoup plus élevée que les valeurs obtenues pour le fil de nylon pêche et le fil de nylon leader, quelque soit la méthode de stérilisation utilisée pour les fils de nylon pêche et leader. Il n'y avait également aucune différence entre le fil de nylon pêche et le fil de nylon leader. La rugosité de surface influence l'adhésion bactérienne sur un polymère et une rugosité de surface élevée augmente la capacité d'adhésion bactérienne d'un implant en général. Ainsi, considérant le critère de rugosité de surface de ces implants, le fil de nylon pêche ou de nylon leader pourrait être plus attrayant que le fil de polyéthylène étudié dans ce projet.

Évaluation de l'adhésion bactérienne de surface

La méthode de stérilisation affectait significativement l'adhésion bactérienne des implants étudiés dans ce projet. La stérilisation au HPGP entraînait une adhésion bactérienne égale ou inférieure à la stérilisation à l'EO ou à la vapeur. Le fil de polyéthylène présentait également une adhésion bactérienne significativement plus élevée par comparaison au fil de nylon pêche et au fil de nylon leader, peu importe la méthode de stérilisation utilisée dans ce projet. Le fil de nylon leader présentait

également une tendance à une adhésion bactérienne moindre que le fil de nylon pêche. Ainsi, considérant le critère d'adhésion bactérienne à la surface de ces implants et le risque d'infection subséquent, le fil de nylon pêche ou de nylon leader pourrait être plus attrayant que le fil de polyéthylène étudié dans ce projet.

Enfin, il est à noter qu'étant donné les nombreux fils de nylon pêche ou de polyéthylène présents sur le marché et les différents processus de manufacture de ces derniers; il est prudent d'indiquer que les résultats obtenus, les remarques ou les recommandations formulées pour les fils étudiés ne peuvent pas être étendus à l'ensemble des fils de nylon pêche ou de polyéthylène présents sur le marché. D'autres études sont nécessaires afin de formuler des recommandations plus générales pour ce type d'implant.

Conclusion générale

Considérant l'absence d'oxydation de surface, l'absence d'effet sur la rugosité de surface, une mouillabilité peu affectée et une adhésion bactérienne similaire ou inférieure à celle obtenue après stérilisation à l'EO ou à la vapeur; la stérilisation au HPGH semble constituer une alternative intéressante à l'EO et à la vapeur pour le type d'implant étudié dans ce projet. Par sa capacité d'adhésion bactérienne *in vitro*, le fil de polyéthylène n'est peut être pas un matériel idéal à implanter lors de stabilisation du genou chez le chien. De futures études seraient nécessaires pour déterminer la signification et l'impact clinique de ces résultats obtenus *in vitro*. Ces projets pourraient constituer des études prospectives à court ou moyen terme en utilisant ce type d'implants et de stérilisation en situation clinique par exemple. La réaction inflammatoire associée à chaque type d'implant et de stérilisation pourrait être ainsi

étudiée et comparée *in vivo*, en considérant en parallèle par exemple les propriétés biomécaniques de ces implants stérilisés ; qui constituent également des propriétés essentielles en situation clinique lors de stabilisation du genou chez le chien et ainsi déterminer la meilleure association possible (implant et stérilisation). D'autres études *in vitro* pourraient également être réalisées et porter notamment sur l'analyse et la comparaison de la cytotoxicité de ces implants stérilisés à l'HPGP, l'EO et la vapeur.

SOURCES DOCUMENTAIRES

1. Arnoczky SP, Marshall JL: The cruciate ligaments of the canine stifle. An anatomical and functional analysis. *Am J Vet Res* 38:1807-1814, 1977
2. Hulse DA, Butler DL, Kay MD, et al: Biomechanics of cranial cruciate ligament reconstruction in the dog I. In vitro laxity testing. *Vet Surg* 12:109-112, 1983
3. Arnoczky SP: The cruciate ligaments: The enigma of the canine stifle. *J Small Anim Pract* 29:71-90, 1988
4. Vasseur PB, Berry CR: Progression of stifle osteoarthritis following reconstruction of the cranial cruciate ligament in 21 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 28:129-136, 1992
5. Caporn TM, Roe SC: Biomechanical evaluation of the suitability of monofilament nylon fishing and leader line for extra-articular stabilization of the canine cruciate ligament deficient stifle. *Vet Comp Orthop Traumatol* 9:126-133, 1996
6. Butler DL, Hulse DA, Kay MD, et al.: Biomechanics of cranial cruciate ligament reconstruction in the dog II. Mechanical properties. *Vet Surg* 12:113-118, 1983
7. Lewis DD, Milthorpe BK, Bellenger CR: Mechanical comparison of materials used for extracapsular stabilization of the stifle joint in dogs. *Aust Vet J* 75:890-896, 1997
8. Sicard GK, Meinen J, Phillips T, et al.: Comparison of fishing line for repair of the cruciate deficient stifle. *Vet Comp Orthop Traumatol* 44:138-141, 1999
9. Sicard GK, Hayashi K, Manley PA: Evaluation of 5 types of fishing material, 2 sterilization methods, and a crimp-clamp system for extra-articular stabilization of the canine stifle joint. *Vet Surg* 31:78-94, 2002
10. Banwell MN, Kerwin SC, Hosgood G, et al.: In vitro evaluation of the 18 and 36kg Securos cranial cruciate ligament repair system™. *Vet Surg* 34:283-288, 2005
11. Anderson CC, Tomlison JL, Daly WR, et al.: Biomechanical evaluation of a crimp clamp system for loop fixation of monofilament nylon leader material used for

- stabilization of the canine stifle joint. *Vet Surg* 27:533-539, 1998
12. Steenland K, Stayner L, Deddens J: Mortality analyses in a cohort of 18 235 ethylene oxide exposed workers: followp up extended from 1987 to 1998. *Occup Environ Med* 61(1):2-7, 2004
 13. Steenland K, Whelan E, Deddens J, et al: Ethylene oxide and breast cancer incidence in a cohort study of 7576 women (United States). *Cancer Causes Control* 14(6):531-539, 2003
 14. Steenland K, Stayner L, Greife A, et al: Mortality among workers exposed to ethylene oxide. *N Eng J Med* 324(20):1402-1407, 1991
 15. Stayner L, Steenland K, Greife A, et al: Exposure-response analysis of cancer mortality in a cohort of workers exposed to ethylene oxide. *Am J Epidemiol* 138(10):787-798, 1993
 16. David FG, Erdal S, William L, Bigner D: Work exposures to animal neurocarcinogens. *Int J Occup Environ Health* 12(1):16-23, 2006
 17. Van Sittert NJ, Boogaard PJ, Natarajan AT, et al: Formation of DNA adducts and induction of mutagenic effects in rats following 4 weeks inhalation exposure to ethylene oxide as a basis for cancer risk assessment. *Mutat Res* 447(1):27-48, 2000
 18. Walker VE, Sisk SC, Upton BP, et al: In vivo mutagenicity of ethylene oxide at the hprt locus in T-lymphocytes of B6C3F1 lacI transgenic mice following inhalation exposure. *Mutat Res* 392(3):211-222, 1997
 19. Lucas AD, Merritt K, Hitchins VM, et al.: Residual ethylene oxide in medical devices and device material. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 66:548-552, 2003
 20. Buben I, Melichercikova V, Novotna N, et al.: Problems associated with sterilization using ethylene oxide—Residues in treated materials. *Cent Eur J Public Health* 7:197-202, 1999

21. An YH, Friedman RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 43:338-348, 1998
22. Gatineau M, Huneault L, Lussier B, et al.: Mechanical evaluation of hydrogen peroxide gas plasma sterilization of nylon lines used for extra-articular stabilization of the canine stifle joint *Vet Surg* 39:48-53, 2010
23. Dulisch ML: Suture reaction following extra-articular stifle stabilisation in the dog. I. A retrospective study of 161 stifles. *J Am Anim Hosp Assoc* 17:569-571, 1981
24. Ertel SI, Ratner BD, Kaul A, et al.: In vitro study of the intrinsic toxicity of synthetic surfaces to cells. *J Biomed Mater Res* 28:667-75, 1994
25. Shuhaiber H, Chugh T, Burns G: In vitro adherence of bacteria to sutures in cardiac surgery. *J Cardiovasc Surg* 30:749-53, 1989
26. Lerouge S, Tabrizian M, Wertheimer MR, et al.: Safety of plasma-based sterilization: Surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes. *Bio-Med Mat and Engineering* 12:3-13, 2002
27. Baldry MGC: The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol* 54:417-423, 1983
28. Cook JL, Luther JK, Beetem J, et al.: Clinical comparison of a novel extracapsular stabilization procedure and tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Vet Surg* 39:315-323, 2010
29. Beale BS, Hulse DA. Canine Cranial Cruciate Ligament Repair Anchor System. Arthrex® Vet Systems. <http://www.arthrexvetsystems.com/int/products/index.cfm>
30. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Nakamura A: Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide, *Biomaterials* 16:177-83, 1995
31. Meijis GF, McCarthy SF, Rizzardo E, et al.: Degradation of medical-grade polyurethane elastomers: the effect of hydrogen peroxide in vitro. *J Biomed Mater Res* 27:345-356,

1993

32. Kinnari TJ, Esteban J, Zamora N, et al.: Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin Microbiol Infect* 16:1036-1041, 2010
33. Tidwell CD, Ertel SI, Ratner BD, et al.: Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir* 13:3404-3413, 1997
34. Ohya Y, Matsunami H, Ouchi T. Cell growth on porous sponges prepared from poly(depsipeptide-co-lactide) having various functional groups. *J Biomater Sci Polym Ed* 15:111-123, 2004
35. Beyer D, Knoll W, Ringsdorf H, et al.: Reduced protein adsorption on plastics via direct plasma deposition of triethylene glycol monoallyl ether. *J Biomed Mater Res* 36:181-189, 1997
36. Scotchford CA, Gilmore CP, Cooper E, et al.: Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *J Biomed Mater Res* 59:84-99, 2002
37. Tang L, Wu Y, Timmons RB. Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces. *J Biomed Mater Res* 42:156-163, 1998
38. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signals through changes in integrin binding. *Biomaterials* 25:5947-5954, 2004
39. Costa L, Luda MP, Trossarelli L, et al.: Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials* 19:659-668, 1998
40. Nair PD: Currently practised sterilization methods—some inadvertent consequences. *J Biomater Appl* 10:121–35, 1995

41. Deng M, Shalaby SW: Effects of γ irradiation, gas environments, and postirradiation aging on ultrahigh molecular weight polyethylene. *J Appl Polymer Sci* 58:2111-1119, 1995
42. Hirata N, Matsumoto K-I, Inishita T, et al.: γ -ray irradiation, autoclave and ethylene oxide sterilization to thermosetting polyurethane: sterilization to polyurethane. *Radiat Phys Chem* 46:377-81, 1995
43. Egitto FD, Vukanovic V, Taylor GN: Plasma etching of organic polymers, in: *Plasma Deposition, Treatments, and Etching of Polymers*, R. D'Agostino, ed., Academic Press, Boston, 1990, pp321-422
44. Liston EM, Martinu L, Wertheimer MR: Plasma surface modification of polymers for improved adhesion: a critical review. *J Adhes Sci Technol* 7:1091-1127, 1993
45. Wertheimer MR, Fozza AC, Hollander A: Industrial processing of polymers by low-pressure plasmas: the role of VUV radiation, *Nuclear Instrum. Methods in Phys. Res B* 151:65-75, 1999
46. Reno F, Lombardi F, Cannas M: UHMWPE oxidation increases granulocytes activation: a role in tissue response after prosthesis implant. *Biomaterials* 24,2895-2900, 2003
47. Ward RA: Phagocytic cell function as an index of biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant* 9:46-56, 1994
48. Peniston SJ, Choi SJ: Effect of Sterilization on the Physicochemical Properties of Molded Poly(L-lactic acid). *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 80B:67-77, 2007
49. Widmer AF, Frei R: Decontamination, disinfection, and sterilization. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller MA, Landry ML, eds. *Manual of clinical microbiology*, 9th edn. Washington, DC, ASM Press, 2007, pp65–96
50. Yakacki CM, Lyons MB, Rech B, et al.: Cytotoxicity and thermomechanical behavior of

- biomedical shape-memory polymer networks post-sterilization. *Biomed Mater* 3:015010, 2008
51. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Nakamura A: Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapor-phase hydrogen-peroxide *Biomaterials* 16(3):177-83, 1995
 52. Nakata S, Umeshita K, Ueyama H, et al.: Aeration time following ethylene oxide sterilization for reusable rigid sterilization containers: Concentration of gaseous ethylene oxide in containers. *Biomed Instrum Technol* 34:121-24, 2000
 53. Vink P, Pleijsier K: Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers. *Biomaterials* 7:225-230, 1986
 54. Handlos V: Kinetics of the aeration of ethylene-oxide sterilized plastics. *Biomaterials* 1:149-157, 1980
 55. Tang L, Hu W: Molecular determinants of biocompatibility. *Expert Rev Med Devices* 2:493-500, 2005
 56. Hu WJ, Eaton JW, Tang L: Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood* 98:1231-1238, 2001
 57. Horbettl TA, Lew KR: Residence time effects on monoclonal antibody binding to adsorbed fibrinogen. *J Biomater Sci Polym Ed* 6:15-33, 1994
 58. Wang YX, Robertson JL, Spillman WB, et al.: Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials and their biocompatibility. *Pharmaceutical Res* 21:1362-1373, 2004
 59. Centola DT, Ayoub KI, Lao NT, et al.: Variables affecting simulated use determination of residual ethylene oxide in medical devices. *J AOAC Int* 84:512-518, 2001
 60. Tang L, Eaton JW: Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. Chapter 20. In *Tissue engineering of prosthetic vascular grafts*; Zilla PP; Greisler HP, Eds, RG Landes Company, Austin, Texas, 1999, pp207-218

61. Anderson JM, Bonfield TL, Ziats NP: Protein adsorption and cellular adhesion and activation on biomedical polymers. *Int J Artif Org* 13:375-382, 1990
62. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, et al.: Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed protein: a review. *Tissue Engineering* 11:1-18, 2005
63. Shen M, Garcia I, Maier RV, et al.: Effects of adsorbed protein and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumor necrosis factor alpha release, and pro-coagulant activity of monocytes. *J Biomed Mater Res* 70A:533-541, 2004
64. Nath N, Hyun J, Ma H, et al.: Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. *Surf. Sci.* 570:98-110, 2004
65. Wang J, Pan CJ, Huang N, et al.: Surface characterization and blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) modified by plasma surface grafting. *Surf Coatings Tech* 196:307-311, 2005
66. Higuchi A, Shirano K, Harashima M, et al.: Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility. *Biomaterials* 23:2659-2666, 2002
67. MacDonald DE, Deo N, Markovic B, et al.: Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 23:1269-1279, 2002
68. Hess H, Vogel V: Molecular shuttles based on motor proteins: active transport in synthetic environments. *J Biotech* 82:67-85, 2001
69. Brodbeck WG, Voskerician G, Ziats NP, et al.: In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J Biomed Mater Res* 64A:320-329, 2003
70. Rhodes NP, Wilson DJ, Williams RL: The effect of gas plasma modification on platelet and contact phase activation processes. *Biomaterials* 28:4561-4570, 2007

71. Kroeze RJ, Helder MN, Roos WH, et al.: The effect of ethylene oxide, glow discharge and electron beam on the surface characteristics of poly(L-lactide-co-caprolactone) and the corresponding cellular response of adipose stem cells. *Acta Biomater* 6:2060-2065, 2010
72. Nakagawa M, Teraoka F, Fujimoto S, et al.: Improvement of cell adhesion on poly(L-lactide) by atmospheric plasma treatment. *J Biomed Mater Res A* 77:112–118, 2006
73. Kim MS, Shin YN, Cho MH, et al.: Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces. *Tissue Eng* 13:2095-2103, 2007
74. Baier RE, Meyer AE, Akers CK, et al.: Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. *Biomaterials* 3:241-245, 1982
75. Wang JH, Claesson PM, Parker JL et al.: Dynamic contact angles and contact angle hysteresis of plasma polymers. *Langmuir* 10:3887-3896, 1994
76. Lee VA, Craig RG, Filisko FE et al.: Preparation and characterization of high-surface area polymer substrates for microcalorimetry. *J Biomed Mater Res* 31:51-62, 1996
77. Lander LM, Siewierski LM, Brittain WJ et al.: A systematic comparison of contact angle methods. *Langmuir* 9:2237-2239, 1993
78. Higashi JM, Wang IW, Shlaes DM, et al.: Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater Res* 39:341-350, 1998
79. Vanoss CJ: Acid–base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 78:1-49, 1993
80. Yotsumoto H, Yoon RH: Application of extended DLVO theory. I. Stability of rutile suspensions. *J Colloid Interface Sci* 157:426-433, 1993
81. Paulsson M, Kober M, Freijlarsen C, et al.: Adhesion of *Staphylococci* to chemically-modified and native polymers, and the influence of preadsorbed fibronectin, vitronectin

- and fibrinogen. *Biomaterials* 14:845-855, 1993
82. Ludwicka A, Jansen B, Wadstrom T, et al.: Attachment of Staphylococci to various synthetic-polymers. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser A Med Microbiol Infect Dis Virol Parasitol* 256:479-489, 1984
 83. Brydon HL, Bayston R, Hayward R, et al.: Reduced bacterial adhesion to hydrocephalus shunt catheters mediated by cerebrospinal fluid proteins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60:671-675, 1996
 84. Quirynen M, Vandermei HC, Bollen CML, et al.: The influence of surface-free energy on supragingival and subgingival plaque microbiology—An in-vivo study on implants. *J Periodontol* 65:162-167, 1994
 85. MacKintosh EE, Patel JD, Marchant RE, et al.: Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *J Biomed Mater Res A* 78:836-842, 2006
 86. Price C, Waters MGJ, Williams DW, et al.: Surface modification of an experimental silicone rubber aimed at reducing initial candidal adhesion. *J Biomed Mater Res* 63:122-128, 2002
 87. Nassar U, Meyer AE, Ogle RE, et al.: The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. *Periodontol* 2000 8:114-124, 1995
 88. Quirynen M, Bollen CML, Papaioannou W, et al.: The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 11:169, 1996
 89. Morgan TD, Wilson M: The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol*. 91:47, 2001
 90. Quirynen M, Vandermei HC, Bollen CML, et al.: An in-vivo study of the influence of

- the surface roughness of implants on the microbiology of supragingival and subgingival plaque. *J Dent Res* 72:1304-1309, 1993
91. Mcallister EW, Carey LC, Brady PG, et al.: The role of polymeric surface smoothness of biliary stents in bacterial adherence, biofilm deposition, and stent occlusion. *Gastrointest Endosc* 39:422-425, 1993
 92. An YH, Friedman RJ, Draughn RA, et al.: Rapid quantification of Staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. *J Microbiol Methods* 24:29-40, 1995
 93. Bollen CML, Papaioanno W, VanEldere J, et al.: The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res* 7:201-211, 1996
 94. Fan YW, Cui FZ, Hou SP, et al.: Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *J Neurosci Methods* 120:17-23, 2002
 95. Tebbs SE, Sawyer A, Elliott TSJ: Influence of surface-morphology on in-vitro bacterial adherence to central venous catheters. *Br J Anaesth* 72:587-591, 1994
 96. Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Bruque JM, et al.: The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 249:99-103, 2004
 97. Tang H, Cao T, Liang X, et al.: Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomed Mater Res* 88A:454-463, 2009
 98. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M: Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater* 13:258-269, 1997

99. An HY, Friedman RJ, Draughn RA, et al.: Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy. *J of Microbiol Methods* 24:29-40, 1995
100. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, et al.: The influence of surface freeenergy and surface-roughness on early plaque-formation— An in vivo study in man. *J Clin Periodontol* 17:138-144, 1990
101. Wendel RN: Surface roughness and contact angle. *J Phys Colloid Chem* 53:1466-1467, 1949
102. Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, et al.: Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue engineering* 7:55-71, 2001
103. Andrews KD, Hunt JA, Black RA: Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials* 28:1014-1026, 2007
104. Lee CJ, Lee KM, Min BI, et al.: Effect of slime-producing *Staphylococcus epidermidis*' adherence capability and time to biomaterials on the antibacterial resistance. *J Korean Orthop Assoc* 30:1564-1572, 1995
105. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, et al.: The influence of skeletal implants on incidence of infection. *J Bone Joint Surg Am* 67:1236-1244, 1985
106. Printzen G: Relevance, pathogenicity and virulence of microorganisms in implant related infections. *Injury* 27:9-15, 1996
107. Arens S, Schlegel U, Printzen G, et al.: Influence of materials for fixationimplants on local infection. *J Bone Joint Surg Br* 78:647-651, 1996
108. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD: Influence of metal implants on infection. *J Bone Joint Surg Br* 76:717-720, 1994

109. Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, et al.: Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol* 21:207-213, 1995
110. Vuong C, Otto M: Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect* 4:481-489, 2002
111. Chu CC, Williams DF: Effects of physical configuration and chemical structure of suture materials on bacterial adhesion. *The Amer Journ of Surg* 147:197-204, 1984
112. Chang CC, Merritt K: Effect of Staphylococcus epidermidis on adherence of pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis to polymethyl methacrylate (PMMA) and gentamycin-containing PMMA. *J Orthop Res* 9:284-288, 1991
113. Baldassarri L, Donelli G, Gelosia A, et al.: Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermidis clinical isolates. *Infect Immun* 64:3410-3415, 1996
114. Barth E, Myrvik QM, Wagner W, et al.: In vitro and in vivo comparative colonization of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis on orthopaedic implant materials. *Biomaterials* 10:325-328, 1989
115. Gristina AG, Hobgood CD, Barth E: Biomaterial specificity, molecular mechanisms, and clinical relevance of S. epidermidis and S. Aureus infections in surgery. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1:143-157, 1987
116. Barth E, Myrvik QM, Wagner W, et al.: In vitro and in vivo comparative colonization of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis on orthopaedic implant materials. *Biomaterials* 10(5):325-328, 1989
117. Verheyen CCPM, Dhert WJA, Blicke-Hogervorst JMA et al.: Adherence to a metal, polymer and composite by staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis. *Biomaterials* 14:383-391, 1993
118. Chu CC, Williams DF: Effects of physical configuration and chemical structure of

- suture materials on bacterial adhesion. *The Amer Journ of Surg* 147:197-204, 1984
119. Quirynen M, Bollen CML: The influence of surface-roughness and surface-free energy on supragingival and subgingival plaque-formation in man—A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22:1-14, 1995
 120. Li BK, Logan BE: Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 36:81-90, 2004
 121. An YH, Friedman RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 43:338-348, 1998
 122. Bayoudh S, Othmane A, Bettaieb F, et al.: Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Mater Sci Eng C Biomimetic Supramol Syst* 26:300-305, 2006
 123. Pavithra D, Doble M,: Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomed Mater* 3:034003, 2008
 124. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ: Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and method for study. *FEMS Microbiol Rev* 23:179-230, 1999
 125. Hogt AH, Dankert J, Feijen J: Adhesion of coagulase-negative staphylococci to methacrylate polymers and copolymers. *J Biomed Mater Res* 20:533-545, 1986
 126. Ha KY, Chung YG, Ryoo SJ: Adherence and biofilm formation of *Staphylococcus Epidermidis* and *Mycobacterium Tuberculosis* on various spinal implants. *Spine* 30:38-43, 2005
 127. Sardin S, Morrier JJ, Benay G, et al.: In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant. Interactions with physicochemical surface properties. *Journ of Oral Rehabilitation* 31:140-148, 2004
 128. Ökte E, Sultan N, Dogan B, et al.: Bacterial adhesion of *Actinobacillus*

- actinomyces comitans serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. J Periodontol 70:1376-1382, 1990
129. Zhao Q, Liu Y, Wang C, et al.: Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. Med Eng Phys 30:341-349, 2008
 130. Roosjen A, Norde W, van der Mei HC, et al.: Characterization of polymer surfaces and thin films. Prog Colloid Polym Sci 132:138-144, 2006
 131. Roosjen A, Norde W, Mei HCvd, et al.: The Use of Positively Charged or Low Surface Free Energy Coatings versus Polymer Brushes in Controlling Biofilm Formation. Progr Colloid Polym Sci 132:138-144, 2006